



FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT
JENA



Molekulare Analyse des Aktinzytoskeletts in *Candida albicans*

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

**von
Diplom-Biologe Ronny Martin**

geboren am 25. Juli 1979 in Meerane

Jena, Dezember 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	5
2.1. Der humanpathogene Pilz <i>Candida albicans</i>	6
2.2. Die Bedeutung der Formine für polarisiertes Wachstum	7
2.3. Endozytose bei Pilzen	9
2.4. Die Regulation der Expression telomerassoziierter Gene in Pilzen	11
3. Material und Methoden	13
3.1. Arbeiten mit <i>Candida albicans</i>	14
3.1.1. Stämme und Medien	14
3.1.2. Transformation von <i>C. albicans</i>	14
3.1.3. Isolierung von <i>C. albicans</i> DNA	19
3.1.4. Porcine Intestinal Epithelium (PIE) Assay	20
3.2. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.1. Stämme und Medien	20
3.2.2. Transformation	20
3.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen	21
3.3. Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
3.3.1. Stämme und Medien	22
3.3.2. Transformation	23
3.3.3. Isolierung von Plasmiden	23
3.4. Arbeiten mit DNA	24
3.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
3.4.2. Gelelektrophorese	24
3.4.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	25
3.4.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	25
3.4.5. Ligation	25
3.4.6. Sequenzierung	25
3.4.7. Herstellung der <i>CTA2p-lacZ</i> -Fusionsplasmide	25
3.4.8. Herstellung der <i>CTA2p-URA3</i> -Fusionsplasmide	26
3.5. Mikroskopie	26
3.5.1. Aktinfärbung	27
3.5.2. Chitininfärbung	27
3.5.3. Mikroskopie mit Fluoreszenzproteinen	28
3.5.4. Anfärbung des Spitzenkörpers	28
3.5.5. Vakuolenfärbung	28
3.5.6. Zeitraffermikroskopie	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Molekulare Analyse der Formingene in <i>Candida albicans</i>	30
4.1.1. Domänenstruktur der Formine und phylogenetische Einordnung	30
4.1.2. Verlangsamtes Wachstum der Formindeletionsmutanten	33
4.1.3. Untersuchungen zur Zellmorphologie der Formindeletionsmutanten während der Hefephase	34
4.1.4. Die Deletion von <i>CaBNII</i> verursacht Defekte bei der Aufrechterhaltung des polaren Hyphenwachstums	36
4.1.5. Untersuchungen zum Aktinzytoskelett	41
4.1.6. Analyse von Endozytose und Vakuolenmorphologie	43
4.1.7. Das Formin Bni1 ist Teil des Spitzenkörpers von <i>C. albicans</i>	44
4.1.8. Auswirkungen der Deletion von <i>CaBNII</i> auf den Spitzenkörper	45
4.1.9. Das konstitutiv aktive <i>ras</i> ^{G13V} -Allel kann die Polarisierungsdefekte in der <i>bni1/bni1</i> -Mutante nicht kompensieren	46
4.1.10. Zugabe von cAMP kann den Phänotyp einer <i>CaBNII</i> -Deletion nicht aufheben	49
4.2. Funktionsanalyse von <i>Candida albicans</i> Genen, deren <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Homologe an der Endozytose und der Chitinsynthese beteiligt sind	51
4.2.1. Verwendung von PCR-basierenden Verfahren zur Deletion von Genen und deren Fusion mit GFP und regulierbaren Promotoren	51

4.2.2. Untersuchung der Vakuolenmorphologie in verschiedenen <i>C. albicans</i> Mutanten	51
4.2.3. Die untersuchten <i>C. albicans</i> Mutanten zeigen keine Defekte während des polaren Hyphenwachstums	54
4.2.4. Funktionelle Analyse von <i>CaPAN1</i>	55
4.2.5. Lokalisierung von Abp1-GFP und Pan1-GFP	58
4.2.6. <i>C. albicans</i> Mutanten ohne funktionelles <i>GNA1</i> -Gen benötigen zum Wachstum N-Acetylglucosamin	59
4.3. Expression der <i>CTA2</i> -Gene in <i>Candida albicans</i>	62
4.3.1. Vergleich der Proteinsequenzen der <i>CTA2</i> -Familie	62
4.3.2. Die meisten <i>CTA2</i> -Gene liegen in der Nähe der Telomere der Chromosomen	65
4.3.3. Expressionsversuche mit <i>lacZ</i>	67
4.3.4. Quantifizierung der Aktivität der <i>CTA2</i> -Promotoren mit CaVENUS-YFP	69
4.3.5. Untersuchungen zur Ausschaltung der Expression von <i>CTA2</i> -Genen	73
4.3.6. Die Zugabe von Trichostatin A verhindert die Stilllegung der <i>CTA2</i> -Gene nicht	78
4.3.7. Die telomerassoziierte Stilllegung von <i>6191_CTA2</i> ist unabhängig von der Histondeacetylase Hda1	79
4.3.8. Untersuchungen zum Telomerpositionseffekt in <i>C. albicans</i>	80
4.3.9. Das <i>C. albicans</i> Gen <i>2661_CTA2</i> kodiert für einen Transkriptionsaktivator	83
5. Diskussion	85
5.1. Molekulare Analyse der <i>Candida albicans</i> Formingene <i>BN11</i> und <i>BNR1</i>	86
5.1.1. Die Deletion von <i>CaBN11</i> führt zu Defekten in der Morphologie, Zytokinese und der Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums	86
5.1.2. Polarisom und Spitzenkörper	87
5.1.3. Ras1-induziertes Hyphenwachstum benötigt das Formin Bni1	88
5.2. Funktionsanalyse von <i>Candida albicans</i> Genen, deren <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Homologe an der Endozytose und der Chitinsynthese beteiligt sind	90
5.2.1. Untersuchungen zur Endozytose und der Vakuolenmorphologie	90
5.2.2. Pan1 ist essentiell für die Endozytose in <i>C. albicans</i>	91
5.3. Expression der <i>CTA2</i> -Gene in <i>Candida albicans</i>	93
5.3.1. Die <i>C. albicans</i> <i>CTA2</i> -Genfamilie	93
5.3.2. Steigerung der Expression von <i>CTA2</i> -Genen während des Hyphenwachstums	93
5.3.3. Ausschaltung der <i>CTA2</i> -Expression	94
5.3.4. <i>2661_CTA2</i> kodiert für einen Transkriptionsfaktor	96
6. Literatur	98
6.1. Fachliteratur	99
6.2. Eigene Literatur	104
7. Abkürzungsverzeichnis	105

1. Zusammenfassung

1. Zusammenfassung

Candida albicans ist einer der wichtigsten humanpathogenen Pilze. Durch einen Wechsel der Morphologie von Hefezellen zu Hyphen ist dieser Organismus in der Lage, Epithelien zu penetrieren und damit ernsthafte Erkrankungen der inneren Wirtsorgane zu verursachen. Die Regulation dieses morphologischen Wechsels stellt ein Hauptgebiet der Arbeiten mit diesem Pilz dar. In dieser Arbeit wurde die Rolle von Forminen für die Zellmorphologie untersucht. *C. albicans* enthält zwei Formine, Bni1 und Bnr1. Es konnte gezeigt werden, dass während der Hefephase beide Formine von Bedeutung für die Zellmorphologie sind, aber nur Bni1 eine zentrale Rolle während des Hyphenwachstums spielt. Mutanten ohne funktionelles Bni1 waren nicht in der Lage, das polarisierte Hyphenwachstum aufrecht zu erhalten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Formin in den Hyphenspitzen mit dem Spitzenkörper kolokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass in *C. albicans* das von Ras1 induzierte filamentöse Wachstum auf ein funktionelles Formin Bni1 angewiesen ist.

Bei der Untersuchung verschiedener *C. albicans* Mutanten wurde herausgefunden, dass *CaPAN1* ein essentielles Gen ist, dessen Deletion dazu führte, dass die Mutanten nicht mehr in der Lage waren den lipophilen Farbstoff FM4-64 aufzunehmen. Damit wurde gezeigt, dass Pan1 notwendig für die Endozytose von *C. albicans* ist.

Das Genom von *C. albicans* enthält repetitive Gene, welche in der CTA2-Familie zusammengefasst werden können. Diese Gene sind telomernah und zeigen während des filamentösen Wachstums eine Steigerung der Expression. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer epigenetischen Genausschaltung zweier CTA2-Gene kommt. Diese Stilllegung der Expression war unabhängig vom morphologischen Status. Es konnten Zusammenhänge zwischen der Genausschaltung und der telomernen Position eines CTA2-Gens gezeigt werden. Diese telomernahe Stilllegung wurde nicht durch die Histondeacetylase Hda1 reguliert und auch die Zugabe des Histondeacetylasehemmers Trichostatin A beeinflusste die Genausschaltung nicht. Auch konnte über ein Ein-Hybrid-System gezeigt werden, dass das vom ORF 19.2661 kodierte Cta2-Protein in *C. albicans* als Transkriptionsaktivator fungiert.

2. Einleitung

2. Einleitung

2.1. Der humanpathogene Pilz *Candida albicans*

Pilze sind eukaryotische Organismen und bilden neben Pflanzen und Tieren ein eigenes Reich innerhalb der Eukarya. Sie leben als Parasiten, Symbionten oder Saprophyten in verschiedenen Habitaten. In vielfältiger Weise werden Pilze vom Menschen genutzt, zum Beispiel zum Verzehr und zur Herstellung von Genuss- und Nahrungsmitteln. Pilzliche Sekundärmetabolite wie β -Lactame, die von *Penicillium* und anderen Pilzen produziert werden, haben eine große Bedeutung für die Herstellung pharmazeutischer Produkte (Brakhage, 1998). Pilze wachsen entweder als einzellige Hefen, wie zum Beispiel die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder sie bilden Myzelien aus mehrzelligen Filamenten, wie beispielsweise *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* und *Ashbya gossypii*. Einige Pilze wie *Candida albicans* und *Ustilago maydis* wachsen dimorph, sind also in der Lage, zwischen hefeartigem und filamentösem Wachstum zu wechseln. Dieser morphologische Wechsel vollzieht sich als Antwort auf spezielle Umweltsignale und wird durch komplexe Prozesse innerhalb der Zelle reguliert (Wendland, 2001). Änderungen der Wachstumsform sind für einige pathogene Pilze wie *Ustilago maydis* mit dem Übergang vom Kommensalen oder Saprophyten zum Parasiten gekennzeichnet.

Candida albicans gehört zu den Ascomyceten und ist ein humanpathogener Pilz, dessen Bedeutung durch die zunehmende Anzahl von Pilzerkrankungen (Mykosen) zunimmt. Pilzinfektionen treten vorwiegend bei Menschen auf, deren Immunsystem von Organtransplantationen, Chemotherapie oder Infektionen geschwächt ist. Zumeist lebt *C. albicans* im menschlichen Körper ohne Erkrankungen hervorzurufen. Diese treten erst bei einer massiven Störung des Immunsystems auf. Die Morphologieänderung von Hefe- zur Hyphenform erlaubt die Penetration von Epithelien und auch die Ausbildung von Biofilmen auf Haut und Schleimhäuten, was als Soor bezeichnet wird. Diese oberflächlichen Infektionen sind im Allgemeinen nicht tödlich. Im Gegensatz dazu gibt es hämatogene Candidosen, bei denen die inneren Organe befallen werden. Diese Erkrankungen werden auch unter dem Begriff Candida-Sepsis zusammengefaßt und verlaufen in der Regel tödlich. Das Umschalten von Hefewachstum zur Hyphenbildung spielt eine entscheidende Rolle bei Candidosen.

C. albicans Mutanten, die nicht in der Lage sind Hyphen auszubilden, sind avirulent (Lo et al., 1997). Neben dem morphologischen Wechsel spielen auch Adhäsine, welche die Bindung an das Wirtsgewebe vermitteln, Phospholipasen und die sekretierten alkalischen Phosphatasen der SAP-Familie eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *C. albicans* (Gale et al., 1998, Hube und Naglik, 2001, Gow et al., 2002). Wie der verwandte Ascomycet *S. cerevisiae* ist auch *C. albicans* ein diploider Organismus. Allerdings wurde bisher bei *C. albicans* kein haploides Stadium nachgewiesen. Die genetischen Voraussetzungen für das Kreuzen von *C. albicans* Stämmen sind vorhanden (Hull und Johnson, 1999). In den letzten Jahren konnten erfolgreich Kreuzungsversuche durchgeführt werden (Magee und Magee, 2000, Hull et al., 2000, Lockhart et al., 2003). Bei der Kreuzung von *C. albicans* kommt es zur Kernverschmelzung und sogar das interspezifische Kreuzen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ist möglich (Pujol et al., 2004). Bisher konnte allerdings keine Meiose bei *C. albicans* nachgewiesen werden. Das haploide Genom von *C. albicans* umfasst 8 Chromosomen (1 bis 7 und R) und besitzt eine Größe von 16 Millionen Basenpaaren. Es wurde vollständig sequenziert (Jones et al., 2004, Braun et al., 2005). Das Genom besitzt etwa 8000 offene Leserahmen (ORFs). Abweichend von anderen Organismen kodiert das Codon CUG nicht für Leucin sondern für Serin (Santos und Tuite, 1995).

2.2. Die Bedeutung der Formine für polarisiertes Wachstum

Wie bereits erwähnt, ist der morphologische Wechsel vom hefezellartigen zum filamentösen Wachstum einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. albicans* (Lo et al., 1997). Voraussetzung für die Ausbildung von Hyphen ist die Festlegung einer Zellpolarität (Wendland und Philippsen, 2001). Während des polaren Hyphenwachstums ist die tatsächliche Wachstumszone auf einen kleinen Bereich der Hyphenspitze konzentriert (Heath und Steinberg, 1999). Diese Zellpolarität wird während des filamentösen Wachstums aufrechterhalten, während im Gegensatz dazu in Hefezellen von *S. cerevisiae* oder *C. albicans* nur während der frühen Phase der Knospenausbildung polares Wachstum stattfindet, welches dann aber ab einem bestimmten Zeitpunkt in isotropes Wachstum übergeht (Lew und Reed, 1995). Zur Ausbildung des polaren Wachstums ist die Polymerisierung von Aktin eine Grundvoraussetzung. In Pilzen gibt es zwei Arten von Aktinfilamenten. Zum einen die kortikalen Aktinpatches, die aus verzweigten Aktinfilamenten bestehen und vom Arp2/3-Komplex synthetisiert werden (Winter et al., 1997), zum anderen die linearen

Aktinfilamente, welche auch als Aktinkabel bezeichnet werden. Die Aktinkabelsynthese erfolgt durch Formine (Evangelista et al., 2002, Pruyne et al., 2002, Sagot et al., 2002a, b). Die dynamische Organisation des Aktinzytoskeletts in Hefezellen und Hyphen ist von entscheidender Bedeutung für das daraus entstehende Wachstumsmuster. Neben der Ausbildung der Zellpolarität sind auch Morphogenese und Zytokinese aktinabhängige, fundamentale Prozesse der Zelle (Drubin und Nelson, 1996). Die räumliche und zeitliche Kontrolle dieser Ereignisse setzt ein spezifisches Netzwerk von Proteinen voraus. Als zentrale Regulatoren des Aktinzytoskeletts fungieren Rho-GTPase-Module. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts als Antwort auf spezielle Umweltsignale und determinieren somit Wachstum und Zellform (Wendland und Philippsen, 2001). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Rho-GTPase Cdc42 in *S. cerevisiae*, *A. gossypii* und *C. albicans* eine wesentliche Rolle für die Etablierung von Zellpolarität und damit für die Ausbildung von Knospen oder Hyphen spielt (Adams et al., 1990, Wendland und Philippsen, 2001, Ushinsky et al., 2002). In *C. albicans* konnte gezeigt werden, dass Cdc42 während des Hyphenwachstums immer in der Hyphenspitze lokalisiert (Hazan und Liu, 2002). Auch andere Rho-GTPasen wie Rho1 sind in verschiedenen Pilzen von großer Bedeutung für verschiedenste Prozesse innerhalb der Zellen (Drgonova et al., 1996, Wendland und Philippsen, 2001). Rho-GTPasen steuern direkt oder indirekt die Funktion der aktinfilamentbildenden Proteinkomplexe (Aktinnukleatoren). In *S. cerevisiae* wird der Arp2/3-Komplex durch die Proteine Abp1, Bee1/Las17 und Pan1 aktiviert (Winter et al., 1999, Duncan et al., 2001, Goode et al., 2001, Lechler et al., 2001). In Deletionsmutanten, die die Arp2/3-vermittelte Aktinsynthese betreffen, wurde keine Veränderung der Aktinkabel beobachtet, so dass geschlussfolgert wurde, dass Aktinpatches und Aktinkabel parallel und unabhängig voneinander synthetisiert werden. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Formine Bni1 und Bnr1 als Nukleatoren für die Synthese der Aktinkabel dienen (Evangelista et al., 2002, Pruyne et al., 2002, Sagot et al., 2002 a und b). Die Formine bilden eine große Familie eukaryotischer Proteine, die durch die Existenz der Formin-Homologie-Regionen (FH) charakterisiert werden. Innerhalb der Formine gibt es eine Unterfamilie, die Diaphanous-verwandten Formine (diaphanous-related formins DRF), die durch eine N-terminale G-Protein-Bindedomäne (GBD) und eine C-terminale Diaphanous-autoregulative Domäne (DAD) gekennzeichnet sind (Alberts, 2001). Die Interaktion dieser beiden Domänen führt zu einer inaktiven Proteinkonformation. Diese

inhibitorische Bindung wird erst durch die Bindung einer Rho-GTPase an die GBD aufgehoben (Wasserman, 1998, Alberts, 2001). Zu den DR-Forminen gehören Bni1 aus *S. cerevisiae* (Zahner et al., 1996, Kohno et al., 1996, Imamura et al., 1997), SepA aus *A. nidulans* (Harris et al., 1997), Bni1 aus *A. gossypii* (Schmitz et al., 2006) und Diaphanous aus *Drosophila melanogaster* (Castrillon und Wasserman, 1994). In Säugetieren wurden ebenfalls DR-Formine beschrieben, zum Beispiel mDia1, mDia2 und mDia3 (Alberts et al., 1998, Watanabe et al., 1997). Die Formine enthalten zwei hochkonservierte Formin-Homologie-Regionen (FH), die prolinreiche FH1-Domäne und die FH2-Domäne (Castrillon und Wasserman, 1994). Eine weitere Domäne, die auch als FH3 bezeichnet wird, ist weniger konserviert und zumindest in *Schizosaccharomyces pombe* für die Lokalisierung der Formine wichtig (Petersen et al., 1998). Die FH1- und die FH2-Domäne sind von essentieller Bedeutung für die forminvermittelte Aktinfilamentsynthese (Pruyne et al., 2002, Sagot et al., 2002b, Pring et al., 2003). Für die Verbindung von Aktinmonomeren zu Aktinfilamenten bildet die FH2-Domäne eine flexible Dimerstruktur (Xu et al., 2004). Dieser Vorgang wird durch das Aktinbindepotein Profilin und die Polarisomkomponente Bud6 unterstützt (Moseley et al., 2004). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass das Formin Bni1 mit den Proteinen Spa2, Bud6 und Pea2 das sogenannte Polarisom bildet. Dieser Proteinkomplex lokalisiert an Stellen polaren Wachstums und alle Mutanten, denen zumindest ein Protein des Polarisoms fehlt, zeigten Defekte beim polarisierten Wachstum (Sheu et al., 1998, Sheu et al., 2000). Auch in *C. albicans* wurden Homologe zu den Polarisomkomponenten Bud6 und Spa2 beschrieben. Eine Deletion der Gene *CaBUD6* und *CaSPA2* führt wie in *S. cerevisiae* zu Polarisierungsdefekten (Crampin et al., 2005, Zheng et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine funktionelle Analyse von *C. albicans* Mutanten ohne funktionelles Bni1 oder Bnr1 durchgeführt werden und vor allem die Auswirkungen auf polarisiertes Wachstum und Zytokinese studiert werden.

2.3. Endozytose bei Pilzen

Das Aktinzytoskelett spielt nicht nur bei der Aufrechterhaltung des polarisierten Wachstums eine entscheidende Rolle, sondern auch bei den Prozessen der Endozytose (Überblick von Moseley und Goode, 2006). Vor allem die kortikalen Aktinpatches sind von essentieller Bedeutung für die Bildung von endozytotischen Vesikeln. Da die Patches durch den Arp2/3-Komplex synthetisiert werden, sind die Arp2/3-Aktivatoren

Abp1, WASP und Pan1 von großem Interesse bei der Untersuchung von Endozytose in Pilzen (Winter et al., 1997). Vor allem in der Bäckerhefe wurde die Funktion dieser drei Proteine intensiv erforscht. Das Protein Pan1, welches ein Homolog des humanen eps15-Proteins ist, besitzt EH-Domänen und aktiviert den Arp2/3-Komplex (Wendland et al., 1996, Tang und Cai, 1996, Duncan et al., 2001). Die Deletion des *PAN1*-Gens in *S. cerevisiae* führt zu Defekten bei der Polarisierung des Aktinzytoskeletts und der Endozytose (Tang und Cai, 1996, Wendland et al., 1996, Tang et al., 1997). Auch ein anderes EH-Domänen besitzendes Protein, Edel, ist an der Endozytose beteiligt, ohne jedoch essentiell zu sein (Gagny et al., 2000). Bee1/Las17 ist das Hefehomolog des humanen N-Wasp-Proteins (Li, 1997). Im Gegensatz zu seinem humanen Homolog fehlt Las17 aber eine G-Proteinbindedomäne. Eine Deletion des *LAS17*-Gens führt in *S. cerevisiae* unter anderem zu Defekten im polaren Wachstum und der Zytokinese (Li, 1997). Auch in *A. gossypii* und in *C. albicans* konnten WASP-Homologe gefunden werden, jeweils Wal1 genannt (Walther und Wendland, 2004a, b). In *A. gossypii* führte eine Deletion des *AgWALI*-Gens nicht nur zu verlangsamtem Wachstum, sondern auch zu einer Fehlverteilung der Aktinpatches, die nicht mehr genau in der Hyphenspitze sondern subapikal lokalisierten (Walther und Wendland, 2004a). In *C. albicans* führte eine Deletion des *CaWALI*-Gens dazu, dass das polarisierte Hyphenwachstum nicht aufrechterhalten werden konnte (Walther und Wendland, 2004b). In beiden Organismen wurde außerdem beobachtet, dass die WASP-Homologen eine wichtige Rolle bei der Fusion von Vakuolen spielen (Walther und Wendland, 2004 a, b). Auch in *S. cerevisiae* zeigten Mutanten ohne funktionelles WASP-Homolog Defekte bei der Endozytose (Naqvi et al., 1998). In *S. cerevisiae* wurden Proteine identifiziert, welche mit Las17/Bee1 interagiert und auch für die Endozytose von Bedeutung sind. Eines dieser Proteine wird Gen *BZZ1* kodiert (Soulard et al., 2002, Soulard et al., 2005). Das *S. cerevisiae* Gen *ABP1* kodiert für ein Aktinbindepotein, welches ebenfalls für die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes benötigt wird (Drubin et al., 1990, Goode et al., 2001). Abp1 ist während der Endozytose am Transport der Vesikel von der Zellmembran in das Zellinnere beteiligt (Kaksonen et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *C. albicans* Gene, deren Hefehomologe für endozytische Proteine kodieren durch PCR-basierende Verfahren deletiert (Gola et al., 2003) und deren Bedeutung für *C. albicans* untersucht.

2.4. Die Regulation der Expression telomerassoziierter Gene in Pilzen

Einzelne Zellen von genetisch isogenen Kulturen weichen durch auffallende Phänotypen von der Mehrheit der Zellen ab. Diese Abweichungen können nur durch eine heterogene Expression spezieller Gene erklärt werden. Diese heterogene Genexpression wurde bei vielen Mikroorganismen beobachtet und ist von großer Bedeutung für zum Beispiel für die Pathobiologie von Krankheitserregern (Avery, 2006).

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* enthält fünf Gene der *FLO*-Familie, von denen vier mit den Telomeren assoziiert sind, während das einzige exprimierte Gen, *FLO11*, nicht in der Nähe von Telomeren oder Centromeren liegt (Guo et al., 2000). Die Expression von *FLO11* ist in *S. cerevisiae* wichtig für Adhäsion an Oberflächen (Reynolds und Fink, 2001) sowie bei der Ausbildung von Pseudohyphen (Gagiano et al., 1999, Lo und Dranginis, 1996). Die Expression der Gene *FLO11* und *FLO10* wird sowohl durch Promotorspezifische Regulation durch Histondeacetylasen wie Hda1, Hst1 und Hst2 als auch durch Positionseffekte reguliert (Halme et al., 2004). In *S. cerevisiae* wurden noch andere Gene, die in der Nähe der Telomere liegen und deren Expression durch den sogenannten Telomerpositionseffekt reguliert wird untersucht (Gottschling et al., 1990, Pirrotta und Gross, 2005). Am Beispiel von *IMD1* konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die promotorspezifische Stilllegung eines Gens abhängig ist von der Nähe zum Telomer (Barton und Kaback, 2006). Dabei wurde auch herausgefunden, dass dieser natürliche Telomerpositionseffekt durch die Deletion von *SIR3* und eine größere Entfernung des Zielgens vom Telomer aufgehoben werden kann (Barton und Kaback, 2006). Für Sir3 wurde auch nachgewiesen, dass es an der Regulation der Expression von *FLO10* beteiligt ist (Halme et al., 2004). Insgesamt wurden über Transkriptionsanalyse über 60 *S. cerevisiae* Gene identifiziert, deren Expression in Mutanten ohne funktionelle Sir2, Sir3 oder Rap1 Proteine gesteigert wurde. Die meisten dieser Gene sind in der Nähe von Telomeren lokalisiert (Wyrick et al., 1999, Vega-Pala et al., 2000, Halme et al., 2004).

Bei Untersuchungen des Transkriptionsprofils von *C. albicans* während des Wechsels zwischen Hefe- und Hyphenwachstum wurde die Hochregulation von sogenannten *CTA2*-Genen beobachtet (Nantel et al., 2002). Diese Gene kodieren vermutlich für Transkriptionsfaktoren (CTA= Candida Transkriptionsaktivator, Kaiser et al., 1999). Durch die Annotierung des Genoms von *C. albicans* (Braun et al., 2005) konnte die Position der verschiedenen *CTA2*-ORFs in der Nähe von Telomeren gezeigt werden. In

Candida dubliniensis wurden Homologe zu den *C. albicans* CTA2-Genen gefunden, jedoch noch keine Aussagen über die mögliche Funktion gemacht (Moran et al., 2004). Interessanterweise gibt es zu den CTA2-Genen keine Homologe in *S. cerevisiae* oder anderen Eukaryoten.

In dieser Arbeit sollten erste Untersuchungen über die Expression ausgewählter CTA2-Gene in *C. albicans* gemacht werden und Rückschlüsse auf die Regulation der Expression ermöglicht werden.

3. Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1. Arbeiten mit *Candida albicans*

3.1.1. Stämme und Medien

Für alle Arbeiten mit *Candida albicans* wurden der Wildtypstamm SC5314 (Gillum et al., 1984, Tabelle 2) und seine Derivate BWP17 (Wilson et al., 1999, Tabelle 2) und SN148 (Noble und Johnson, 2005, Tabelle 2) verwendet. Für die Transformation wurde BWP17 in YPD (Yeast extract Peptone Dextrose, 10g/l Casein-Pepton, 20g/l Glucose, 20g/l Hefeextrakt) bei 30°C angezogen. Zur Selektion der transformierten Stämme wurde SD Minimalmedium (20g/l Agar, 20g/l Glucose, 6,7g/l Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat, YNB, Qbiogen) verwendet. Um die Auxotrophien von BWP17 und seinen Derivaten auszugleichen wurden je nach Bedarf Arginin (20mg/l), Histidin (20mg/l) oder Uridin (40mg/l) zugegeben. Zum Anschalten von *CaMAL2*-Promotor-regulierten Allelen wurden die betreffenden Stämme auf Minimalmedium angezogen, welches 20g/l Maltose als Ersatz für Glucose enthält. Für die Hypheninduktion von *C. albicans* bei 37°C wurde SD-Medium mit 10% Serum (Calf Serum, Sigma) beziehungsweise N-Acetylglucosamin (0,5g/l, Roth) verwendet. Alternativ wurde SPIDER-Medium (20g/l Agar, 2g/l Dikaliumhydrogenphosphat, 10g/l Hefeextrakt, 10g/l Mannit, 5g/l Natriumchlorid, 16g/l Trypton, nach Liu et al., 1994) benutzt. Für Tests mit 5-Fluoroorotsäure (5-FOA, Fermentas) wurde mit DMSO eine Stammlösung von 50mg/ml hergestellt. Platten mit 5-FOA enthielten eine Konzentration von 1mg/ml.

3.1.2. Transformation von *C. albicans*

Alle für die Transformation verwendeten PCR-Produkte wurden mit Oligonukleotidprimern (Tabelle 1) von pFA-Plasmiden amplifiziert (siehe Tabelle 3). Dafür wurden nach bereits beschriebenen Methoden S1- und S2-Oligonukleotidprimer benutzt (Gola et al., 2003). Diese Primer enthalten am 5'-Ende eine 100bp lange Sequenz homolog zum Zielgen und am 3'-Ende 20bp, welche komplementär zum jeweiligen pFA-Plasmid sind (Tabelle 1). Die *C. albicans* Stämme wurden entweder nach der Lithiumacetat-Methode oder durch Elektroporation (Walther und Wendland, 2003, Köhler et al., 1997) transformiert. Unabhängig von der Methode wurden jeweils 25µl PCR-Produkt mit der Zellsuspension gemischt und transformiert. Die

Elektroporation erfolgte mit Küvetten mit Elektrodenabstand von 2mm bei einem Puls von 1,8kV. Je 100µl Transformationsansatz wurden auf die Selektionsplatten ausplattiert und für 2 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert.

Tabelle 1. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer.

<i>CaBNII</i>
S1-BNI1: ATCACAAACATCTTTTCATCATCCACTACTATCACCAGTGCTAGTGCAGTT TCAATTAATTACCATATTCTTCAACCTCATCCTCCCTTACCTCCTCCCTgaagcttcgtacgctgcaggtc
S2-BNI1:CTTAACCTTGTAACCTCACATGGTATATAATATGTAAATACAACCTTTGTACAGATAT AAAAATTAATAGCTATATTTTCATTTAAATACATATACAAAAAAAtctgatcatcgatgaattcgag
G1-BNI1: CTCTCTGAGGGAGACAACGC
G4-BNI1: CAGGTTTCCAAATTGAATCGTCC
G1-BNI1-FP: CCGCCTGAAGGA TGCTG
I1-BNI1: GGAAATCAAGAACCAGAGCCTTG
I2-BNI1: CTCTGGCAAAGCCGGCAACAC
S1-BNI1-GFP: GTTCAAATAGATCTTGATGAAGTGGCTAAGAATAACAATAGT GAGGGTGCTGGCGCAGGTGCTTC
S2-BNI1-GFP:CATTTAAATACATATACAAAAAAAGTGCTTCTCCTTAGCAGGCCTCTGATA TCATCGATGAATTCGAG
<i>CaBNRI</i>
S1-BNR1: GTTGTTTTTTTTTTTCAAACGCGACTTCTAAATCTCTAGCC ATACCCGATCCAGAAACACTTGTTTTAAATTTTTTGGTTACCACACACACAAAAATATTCgaa gcttcgtacgctgcaggtc
S1-BNR1: GTTGTTTTTTTTTTTCAAACGCGACTTCTAAATCTCTAGCCATACCCGATCCAGAAACACTTG TTTTAAATTTTTTGGTTACCACACACACAAAAATATTCgaagcttcgtacgctgcaggtc
G1-BNR1: GTAAGCACCGAGTCTTGTCGC
G4-BNR1: GGAAATTTCTACTCAACGAGCG
I1-BNR1: GAGATAGATTCCAGGAACACGAG
I2-BNR1: CACCAATGCCTTGACGACGTACAC
<i>CaADE2</i>
CaADE2-down: GGTCGTATGATTGTTGAAGCAGCAC
CaADE2-up: CCAGAGTTGTGAGGTCTTGGTGC
CaADE2-hisG-veri: GCAACTGTCAAACGC
<i>CaRAS1</i>
CaRAS1-intern: GGAAAGACAAGTTAGTTATCAAGATGG
<i>StlacZ</i>
lacZ-up: CCATTAAGAGATTGTCTTAACTTCATCTC
<i>CaVENUS</i>
venus-up: GGCCATGGAACTGGCAATTTACC
<i>GFP</i>
XFP-fusion-seq: CATAACCTTCGGGCATGGCACTC
<i>CaARG4</i>
A2: AATGGATCAGTGGCACCGGTG
A3: GGATATGTTGGCTACTGATTTAGC
<i>CaHIS1</i>
H2: CAACGAAATGGCCTCCCTACCACAG
H3: GGACGAATTGAAGAAAGCTGGTGCAACCG
<i>CaURA3</i>
U2: GTGTTACGAATCAATGGCACTACAGC
U3: GGAGTTGGATTAGATGATAAAGGTGATGG
XhoI-URA3: cggccgctcgagATGACAGTCAACACTAAGACCTATAGTGAG
XmaI-URA3: gctcccccgggAAACTAGAAGGACCACCTTTGATTGTAAATAG

URA3-intern-up: GCTCCCTGTTTTAATCCTTCAACC
<i>CdHIS1</i>
G2-CdHIS1: TCTAAACTGTATATCGGCACCGCTC
G3-CdHIS1: GCTGGCGCAACAGATATATTGGTGC
<i>CmLEU2</i>
G2-CmLEU2: CGGTACCGACGTGATCACCTGGTA
G3-CmLEU2: GTTGGTGACGCGATTGTCTGAAGCTG
<i>CaPAN1</i>
S1-PAN1: TTCATTTTTCTTTGATTCCGCCAACAAATTAATTTACCTTAAACTTTTGTGTGT TCGATATACTTGTGTTGCCAATCTATCGTAATTAATCAGCATTGAGTGgaagcttcgtacgtgcaggtc
S2-PAN1: AACTGAATAAACATTTGTATTTAAAGATATATGTATATAATTTAATA ATAGCTAAATTATTTGAAAACAAAATGATGCTGATTAGTATGCGTATATTTTcttgatcatcatgatgaa ttcgag
G1-PAN1: CTTTCGTA CTGGACGACTG
G4-PAN1: CCAAACCACAGTGAAGGGAC
S1-PAN1-GFP: GCACCAAATATTGGTGCATTGTTAGGTCAAATCACTGGTGGCGCTTCGTTG AGAAAAGTGGAGACAAAAGTTTCCTCTGGTGCTACAGTTGGAAGAGTTTTGggtgctggcgaggtgc ttc
G4-PAN1-GFP: GAATGAAGCACCACTGTGCC
I1-PAN1: CCGTTACGGAGGATGTTGGAC
I2-PAN1: GCGGGTTCTCGGTTCTTGG
S2-PAN1-MET: GGGGTTGCTGAGGCATTTGGTAATTATTGTAGCCATATCCAGTCTGTTGTT GGGGATTGTACCCCATACCTTGTGTTGCTGTTGATACGGGTTATAcattgtttctggggagggatttacc
G2-PAN1prom: CCACTACCACCACTGGTCTG
<i>CaGNA1</i>
S1-GNA1: AGATTGCCTTTCCTTTCCTTTCCTGTTTTTTGGGGCTTGTTGAGTTCAAT TATTCTACGTCATTTTTTTTTTAAATTATTAATCATTGCCACGTCATATAgaagcttcgtacgtgcaggtc
S2-GNA1: ATGTATCTATTATGTATGATGTTTCCATTCCCCCCCCCTTCCACTCCCACTCCA CTTCTTAAATGGGTATTATTGGACAAAATCCCCGAACATAATGTCcttgatcatcatgaattcgag
G1-GNA1: GTCGCGTGTGTTGTATAGGCCG
G4-GNA1: CAGGTTTCCTTTCCTTTTTTAGGC
I1-GNA1: GCTGTTACCACAAGGTTATAC
I2-GNA1: CAACACCACCATCTTTATAACC
<i>6191_CTA2</i>
G4-B: CTTCGTTTACGTGGTCGCCATTG
P3-B: tcgacaggtaccAGGAGTGCATTCTATGGCCTCTG
P2-B: ctcgagGGTGGGGGGAAATAAAGGTGTG
P5-B: tcgacaggtaccACCAATGTTGACCTAATACGCACGAC
B-P-1 new: ggtaccCTGAACCCGAATCCATGAGCGTGG
5'-cDNA-6191_CTA2: ATGCCAGAAAACCTCCAAACAAGATTACATAACTC
3'-cDNA-6191_CTA2: GAATATTTGCACACGAATTAAGTAGTGC
5'-6191-MluI-Linker: GGTCCacgcgttGGTGGAGGTCCAGGTGGACCAGAAAACCTCCAA ACAAGATTACATAACTC
3'-6191-PstI: GCCCGCctgcagCTAATTGCCAACTGGTTTAAAAAGCTGTG
<i>2661_CTA2</i>
P5-A: tcgacaggtaccACTGCTCAACGGCGAAATCCAAAAC
P2-A: ctcgagGGCCTCCTCTGCCTACTTCGTAAGTCTCCAC
A-P1b new: ggtaccGGTTACAGAACTGCTAGTGTGGC
3'-cDNA-2661_CTA2: CGAGCAATGTCATGTTCAACCC
G1-2661_CTA2 new: CTCGGTCTCTATATCCTAAATACC
5'-2661-MluI-Linker: GGTCCacgcgttGGTGGAGGTCCAGGTGGACCAGAAAACCTCCA AACAAGATTAC
3'-2661-PstI: GCCCGCctgcagCTAATTACCAAACCTGGTTTAAAAAGCTGTCTAC
<i>CaACT1</i>
ACT1prom-veri: GAGCAAGGGAGAGAGAGATTTG
<i>CaHDA1</i>
S1-HDA1: TGGCCGATACTAATCACCGCTTACATATTGTAACCAGTCAATATCATAAAA

AAAATTAACATTCCGAAATTCATTATTAAGGAATTATATAGAAGCTACCCgaagcttcgtacgctgcaggtc
S2-HDA1: GGCTCGTTCCTTTATTTTTCAAAAAATTAATAAGATTAAAAAACTCCTTACACATA CACTATACATAATCATCATTACAACCTCTCAGATCTATATCTATTCTCtctgatcatcgatgaattcgag
G1-HDA1: CATTGTGTGAGTAGAGTTCCACAACAAGTG
G4-HDA1: CACCACCAGCTGTACCAATGAACCTATCGTC
I1-HDA1: CATGCTAAAGTATTACATCCTATAGTG
I2-HDA1: CTGCCAACGCACTCTTGCTAATAGAGTC
SalexA
lexA-veri: GCAACTGTCAAACGC
CaRPS1
RPS1-veri: CGTATTCACCTTAATCCCACAC
pDrive-Plasmid
pDR-veri: GACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGC
pAU36-Plasmid
pAU-veri: GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAG

Alle Oligonukleotidprimer sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die kleingedruckten Buchstaben zeigen bei den S-Primern die Homologieregionen zu den pFA-Plasmiden an. Bei anderen Primern stehen die kleingedruckten Buchstaben für Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Fettgedruckt sind die Linkersequenzen für die lexA-Fusionen.

Die Verifizierung der Transformanten erfolgte über PCR auf Zellmaterial der gewachsenen Kolonien. Zum Nachweis des 5'-Endes eines Markergens wurde eine PCR mit einem G1-Primer, der in der Region vor dem Zielgen und einem G2-Primer (oder U2, H2, A2 für die jeweiligen Markergene, Tabelle 1), der im Markergen binden konnte, durchgeführt. Analog wurde das 3'-Ende des Markers mit einem hinter dem Zielgen bindenden G4- und einem im Markergen bindenden G3 (U3, H3, A3)-Primer amplifiziert. Wurden beide Markerenden nachgewiesen, galt die Integration des Markers als sicher. Für die Deletion eines Zielgens wurde neben der Verifizierung der Integration der verwendeten Marker überprüft, ob es noch Wildtypallele gibt. Dafür wurde eine PCR mit I1 und I2 Oligonukleotidprimern durchgeführt, die im Zielgen binden (Tabelle 1). Wenn dieses PCR-Produkt auf Zellen einer Homozygote nicht amplifiziert werden konnte, galt die Homozygote als sicher, da kein Wildtypallel mehr nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten *C. albicans* Stämme.

<i>C. albicans</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
SC5314	<i>C. albicans</i> Wildtyp	Gillum et al., 1984
BWP17	<i>ura3::λimm34/ura3::λimm34</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	Wilson et al., 1999
SN148	<i>arg4Δ/arg4Δ, leu2Δ/leu2Δ</i> <i>his1Δ/his1Δ</i> <i>ura3Δ::imm434/ ura3Δ::imm434/</i>	Noble und Johnson, 2005
CAI-8 +SalexA-lexOP ^a	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2, RPS1/rps1::SalexA -</i>	Russell und Brown,

	<i>CaURA3</i>	2005
CAI8-SalexA-NRG1-lexOP ^a	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2, RPS1/rps1::SalexA-NRG1-CaURA3</i>	Russell und Brown, 2005
CAI8-SalexA-GCN4-lexOP ^a	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2, RPS1/rps1::SalexA-GCN4-CaURA3</i>	Russell und Brown, 2005
CAJ04 ^{a3}	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2,ura3</i>	J. Bauer
CAJ044 ^a	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2,ura3</i>	J. Bauer
CJW6	<i>ede1::CaHIS1/ede1::CaURA3, arg4</i>	Martin et al., 2006
CJW7	<i>ede1::CaURA3/ede1::CaHIS1, arg4</i>	Martin et al., 2006
CJW9	<i>abp1::CaURA3/ABP1-GFP::CaHIS1, arg4</i>	Martin et al., 2006
CAJ05	<i>abp1::CaHIS1/abp1::ARG4, ura3</i>	Martin et al., 2006
CAJ06	<i>abp1::CaURA3/abp1::CaARG4, his1</i>	Martin et al., 2006
CAB4	<i>bzz1::CaARG4/bzz1::CaHIS1, ura3</i>	Martin et al., 2006
CAB5	<i>bzz1::CaURA3/bzz1::CaHIS1, arg4</i>	Martin et al., 2006
CAY2h	<i>smy1::URA3/smy1::ARG4, his1</i>	Martin et al., 2006
CAY2i	<i>Smy1::CaARG4/smy1::SAT1, his1, ura3</i>	Martin et al., 2006
GC11	<i>BNI1/bni1::CaURA3, arg4, his1</i>	Martin et al., 2005
GC13	<i>BNR1/bnr1::CaURA3, arg4, his1</i>	Martin et al., 2005
GC14	<i>bni1::CaURA3/bni1::CaHIS1, arg4</i>	Martin et al., 2005
GC19	<i>bnr1::CaURA3/bnr1::CaHIS1, arg4</i>	Martin et al., 2005
GC21	<i>BNI1/bni1::CaHIS1, arg4, ura3</i>	Martin et al., 2005
GC22	<i>BNR1/bnr1::CaHIS1, arg4, ura3</i>	Martin et al., 2005
GC23	<i>bni1::CaHIS1/bni1::CaURA3, arg4</i>	Martin et al., 2005
GC40	<i>bni1::CaHIS1/bni1::CaARG4, ura3</i>	Martin et al., 2005
GC26	<i>GNA1/gna1::CaHIS1, arg4, ura3</i>	Martin et al., 2005
GC27	<i>GNA1/gna1::CaURA3, arg4, his1</i>	Martin et al., 2005
GC31	<i>gna1::CaURA3/gna1::CaHIS1, arg4</i>	Martin et al., 2005
GC42	<i>ADE2/ade2::MALp-ras1^{G13V}::CaURA3, arg4, his1</i>	Martin et al., 2005
GC46	<i>bni1::CaHIS1/bni1::CaARG4, ADE2/ade2::MALp-ras1^{G13V}::CaURA3</i>	Martin et al., 2005
GC48	<i>bni1::CaHIS1/bni1::CaARG4, ura3</i>	Martin et al., 2005
GC49	<i>bni1::CaHIS1/bni1::CaARG4, ADE2/ade2::MALp-ras1^{G13V}::CaURA3</i>	Martin et al., 2005
GC57	<i>PAN1/pan1::CaURA3, arg4, his1</i>	Martin et al., 2006
GC58	<i>pan1::CaURA3/PAN1-GFP::CaHIS1, arg4</i>	Martin et al., 2006
GC59	<i>BNI1/BNI1-GFP::CaURA3, arg4, his1</i>	Martin et al., 2005
GC76	<i>ACT1/ACT1p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC77	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC78	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC85	<i>2661_CTA2/2661_CTA2p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC89	<i>ACT1/ACT1p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC90	<i>ACT1/ACT1p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC93	<i>2661_CTA2/2661_CTA2p::CaVENUS-CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC94	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p::CaVENUS-CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC101 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p::StlacZ-CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC102 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p::StlacZ-CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC103 ^b	<i>ACT1/ACT1p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC104 ^b	<i>ACT1/ACT1p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC105 ^b	<i>2661_CTA2/2661_CTA2p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC106 ^b	<i>2661_CTA2/2661_CTA2p-StlacZ::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit

	<i>his1, leu2</i>	
GC107	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p::CaURA3, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC108 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC109 ^b	<i>ACT1/ACT1p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC110 ^b	<i>ACT1/ACT1p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC111 ^b	<i>2661_CTA2/2661_CTA2p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC112 ^b	<i>2661_CTA2/2661_CTA2p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC113 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC114 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-CaVENUS::CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC115	<i>gna1::CaHIS1/gna1::CaARG4, ura3</i>	diese Arbeit
GC118 ^b	<i>2661_CTA2/2661_CTA2prom-CaURA3, arg4, his1, leu2</i>	diese Arbeit
GC123 ^b	<i>HDA1/hda1::CmLEU2, arg4, his1, ura3</i>	diese Arbeit
GC124 ^b	<i>hda1::CmLEU2/hda1::CdHIS1, arg4, ura3</i>	diese Arbeit
GC125 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2prom-CaURA3, HDA1/hda1::CmLEU2, arg4 his1</i>	diese Arbeit
GC126 ^b	<i>hda1::CmLEU2/hda1::CdHIS1, 6191_CTA2/6191_CTA2prom-CaURA3, arg4</i>	diese Arbeit
GC127 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2prom-CaURA3, hda1::CmLEU2/hda1::CaARG4, his1</i>	diese Arbeit
GC129 ^b	<i>PAN1/CmLEU2-MET3p-PAN1, arg4, his1, ura3</i>	Martin et al., 2006
GC132 ^b	<i>CmLEU2-MET3p-PAN1/pan1::CaURA3, arg4, his1</i>	Martin et al., 2006
GC133 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-URA3, HDA1/hda1::CmLEU2, arg4, his1</i>	diese Arbeit
GC134 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-URA3, hda1::CmLEU2/hda1::CdHIS1, arg4</i>	diese Arbeit
GC135 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-lacZ-pRS415-lacZ-ScLEU2-lacZ-CaURA3, his1, arg4</i>	diese Arbeit
GC136 ^b	<i>6191_CTA2/6191_CTA2p-lacZ-pRS415-lacZ-ScLEU2-lacZ-CaURA3, his1, arg4</i>	diese Arbeit
GC137 ^c	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2, RPS1/rps1::SalexA-2661_CTA2::CaURA3</i>	diese Arbeit
GC138 ^c	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2, RPS1/rps1::SalexA-2661_CTA2::CaURA3</i>	diese Arbeit
GC139 ^c	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2, RPS1/rps1::SalexA-6191_CTA2::CaURA3</i>	diese Arbeit
GC140 ^c	<i>ade2::hisG/OP-LacZ-ADE2, RPS1/rps1::SalexA-6191_CTA2::CaURA3</i>	diese Arbeit

Alle GC-Stämme sind Derivate von BWP17, außer die mit ^b gekennzeichneten, welche Derivate von SN148 sind. Mit ^a markierte Stämme sind aus CAI-8 entstanden.

3.1.3 Isolierung von *C. albicans* DNA

Genomische DNA des *C. albicans* Wildtyps SC5314 wurde nach dem Protokoll von Hoffman und Winston (1987) isoliert. Dafür wurden die Zellen einer stationären Zellkultur durch Zentrifugation gewonnen. Mit Glasperlen (0,25-0,5mm Durchmesser, Roth) und Phenol wurden die Zellen zur Gewinnung der Nukleinsäuren aufgeschlossen.

Durch RNaseA-Behandlung wurde sichergestellt, dass es keine Verunreinigungen mit RNA gab. Mit Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 wurde die DNA vom Phenol gereinigt und nach einer Fällung mit Natriumacetat (3M, pH5,2) und 2-Propanol in Wasser aufgenommen und weiterverwendet.

3.1.4. Porcine Intestinal Epithelium (PIE) Assay

Der Schweinedarmepitheliumversuch (PIE) wurde nach dem bereits beschriebenen Protokoll unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Wendland et al., 2006). Blinddarmepithel wurde aus frisch geschlachteten Schweinen entnommen und in Ringerlösung gegeben (9g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 0,2g/l CaCl, 0,1g/l NaHCO₃, 1g/l Glucose). Die Darmstücke wurden mit Ringerlösung gewaschen und dann in Petrischalen mit Ringerlösung gegeben und mit einer *C. albicans* Zellsuspension beimpft. Anschließend wurden die Ansätze für 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Darmstücke wurden danach mit Ringerlösung gewaschen. Die adhärierten Zellen wurden nachfolgend abgetrennt und mit Calcofluor gefärbt, um die *C. albicans* Zellen sichtbar zu machen.

3.2. Arbeiten mit *Escherichia coli*

3.2.1. Stämme und Medien

Zur Vermehrung von Plasmid- DNA wurde der *E. coli*- Stamm DH5 α (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, F⁻, *080dlacZAM15*) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in 2YT- Medium (1,6% Trypton, 1% Hefeextrakt, 0,5% NaCl). Für die Selektion nach der Transformation wurden zum Medium 100 μ g/ml Ampicillin zugegeben.

3.2.2. Transformation

Vorbereitend auf die Transformation wurden elektrokompente Zellen hergestellt. Dafür wurden 50ml 2YT- Medium mit Zellen von *E. coli* DH5 α angeimpft und für 16h bei 37°C und 180U/min inkubiert. Aus dieser Kultur wurde ein Erlenmeyerkolben mit 1000ml 2YT- Medium 1:100 angeimpft und bei 37°C und 180 U/min schüttelnd inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,8 wurden die Zellen für

15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000U/min und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend in 20ml 10%-tigem Glycerin resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut für 15 Minuten bei 4000U/min und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 5ml 10%-tigem Glycerin resuspendiert und auf Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt (Dower et al., 1988, Calvin und Hanawaldt, 1988).

Für die Transformation wurden die elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut. 2YT-Medium und die verwendeten Elektroporationsküvetten (2mm Elektrodenabstand) wurden auf Eis vorgekühlt. Der Transformationsansatz bestand aus 5µl Plasmid- DNA und 50µl Zellen, welche gut durchmischt, luftblasenfrei in die Küvetten überführt wurden. Die Elektroporation erfolgte mit 2500V. Sofort nach dem Strompuls wurden die Zellen in 1ml kalten 2YT- Medium aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und für mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Von der Zellsuspension wurden 50-150µl auf 2YT- Platten mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und für mindestens 12h bei 37°C inkubiert.

3.2.3. Isolierung von Plasmid- DNA aus *E. coli* Zellen

Um Plasmid- DNA aus den Zellen zu gewinnen, wurde eine alkalische Lyse durchgeführt (Ish-Horowicz und Burke, 1981). Dafür wurden 3ml 2YT- Medium mit Zellmaterial der Transformanten beimpft und für mindestens 12h bei 37°C und 180U/min angezogen. Anschließend wurde ein Eppendorfgefäß mit 1,5ml Kultur befüllt und für 30 Sekunden bei 13000U/ min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250µl P1- Puffer (50mM Glucose, 25mM TRIS pH 8, 10mM EDTA) resuspendiert. Nachfolgend wurden 250µl P2- Puffer (200mM NaOH, 1% SDS) zugegeben und die Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 250µl P3- Puffer (2,55M Kaliumacetat pH 4,8) zugegeben und die Suspension für eine Dauer 15 Minuten mit 13000U/min abzentrifugiert. Das Lysesediment wurde verworfen und der Überstand mit 750µl 2- Propanol versetzt und für eine Dauer von 25 Minuten mit 13000U/min abzentrifugiert. Die gefällte DNA wurde nochmal mit 250µl 70%-tigem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Zum Abschluss wurde das Pellet in 50µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Um größere Mengen Plasmid- DNA zu gewinnen, wurden Qiagen- Säulen nach den Angaben des Herstellers verwendet (Qiagen, Hilden). Dafür wurden Zellen der gewünschten *E. coli* Stämme in 100ml 2YT- Medium für 16h bei 37°C und 180U/ min angezogen.

Tabelle 3. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Herkunft
pFA-CaURA3	<i>CaURA3, amp^R</i>	Gola et al., 2003
pFA-CaHIS1	<i>CaHIS1, amp^R</i>	Gola et al., 2003
pFA-CaARG4	<i>CaARG4, amp^R</i>	Gola et al., 2003
pFA-CmLEU2	<i>CmLEU2, amp^R</i>	Schaub et al., 2006
pFA-CdHIS1	<i>CdHIS1, amp^R</i>	Schaub et al., 2006
pFA-GFP-CaURA3	<i>GFP^{S65A,V68L,S72A}, CaURA3, amp^R</i>	Gola et al., 2003
pQF145.2	<i>CaADE2-CaMAL2p-rasI^{G13V}-CaURA3-CaADE2, amp^R</i>	Feng et al., 1999
pAU36	<i>CaACT1p, StlacZ, CaURA3, amp^R</i>	Uhl und Johnson, 2001
Clp-lexA	<i>CaACT1p, SalexA, CaRPS1, CaURA3, amp^R</i>	Russell und Brown, 2005
pRS415	<i>ScLEU2, Cen-ARS, amp^R</i>	Sikorski und Hieter, 1989
pFA-CaVenus-CaURA3	<i>CaVENUS, CaURA3, amp^R</i>	Y. Schaub
pDrive	<i>kan^R, amp^R</i>	Qiagen
pDrive-6191prom	<i>6191_CTA2p, kan^R, amp^R</i>	J. Bauer
pRS415-BNII-GFP-CaURA3	<i>ScLEU2, BNII- GFP^{S65A,V68L,S72A}-CaURA3, amp^R</i>	diese Arbeit
pDrive-2661prom	<i>2661_CTA2p, kan^R, amp^R</i>	diese Arbeit
pAU-6191prom-lacZ	<i>6191_CTA2p, StlacZ, CaURA3, amp^R</i>	diese Arbeit
pDrive-2661prom-lacZ	<i>2661_CTA2p, StlacZ, kan^R, amp^R</i>	diese Arbeit
pDrive-2661prom-lacZ-CaURA3	<i>2661_CTA2p, StlacZ, CaURA3, kan^R, amp^R</i>	diese Arbeit
pAU-CaACT1prom-CaVenus	<i>CaACT1p, CaVENUS, CaURA3, amp^R</i>	diese Arbeit
pAU-6191prom-CaVenus	<i>6191_CTA2p, CaVENUS, CaURA3, amp^R</i>	diese Arbeit
pAU-2661prom-CaVenus	<i>2661_CTA2p, CaVENUS, CaURA3, amp^R</i>	diese Arbeit
pDrive-6191prom-CaURA3	<i>6191_CTA2p, CaURA3, kan^R, amp^R</i>	diese Arbeit
pDrive-2661prom-CaURA3	<i>2661_CTA2p, CaURA3, kan^R, amp^R</i>	diese Arbeit
Clp-lexA-6191_CTA2	<i>CaACT1p, SalexA-6191_CTA2, CaRPS1, CaURA3, amp^R</i>	diese Arbeit
Clp-lexA-2661_CTA2	<i>CaACT1p, SalexA-6191_CTA2, CaRPS1, CaURA3, amp^R</i>	diese Arbeit
pRS415-lacZ	<i>ScLEU2, StlacZ, amp^R</i>	diese Arbeit

3.3. Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1. Stämme und Medien

Für die Arbeiten mit *S. cerevisiae* wurde der Stamm BY4742 (MAT α $\Delta his3 \Delta leu2 \Delta lys1 \Delta ura3$, EUROSCARF) verwendet. Die Zellen wurden in Vorbereitung für die Transformation für 16h in YPD-Vollmedium bei 30°C angezogen und nach der Transformation auf SD-Agarplatten ausplattiert und für 2Tage bei 30°C inkubiert. Für

die Plasmidisolierung wurden die ausgewählten BY4742-Derivate in CSM-LEU-Minimalmedium auf einem Heferad für 16h bei 30°C und 40U/min angezogen.

3.3.2. Transformation

Die Transformation von *S. cerevisiae* BY4742 wurde nach der etablierten Lithiumacetat-Methode von Gietz et al. (1995) durchgeführt. Von den Transformationsansätzen wurden 25-100µl auf Selektionsplatten ausplattiert. Diese wurden für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

3.3.3. Isolierung von Plasmiden

Nach erfolgreicher Verifizierung von BY4742-Transformanten mittels PCR auf Zellmaterial, wurden Kolonien in 5ml CSM-LEU-Medium angeimpft und für 16h auf einem Heferad bei 40U/min und 30°C inkubiert. Danach wurden jeweils 1,5ml der Kulturen in Eppendorfgefäße überführt und für 30 Sekunden bei 13000U/min und Raumtemperatur abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Kulturen restlos abzentrifugiert waren. Danach wurde das Pellet in 1,5ml 1M STE-Puffer (1M Sorbitol, 50mM TRIS, 100mM EDTA) resuspendiert und mit 20µl Zymolyase (2,5µg/µl) versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei die Protoplastierung der Zellen mikroskopisch überprüft wurde. Anschließend wurden 50µl 10%-tige SDS-Lösung zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 65°C. Danach wurden 2,55M Kaliumacetat-Puffer (P3-Puffer aus 3.2.3.) zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde die Suspension für 15 Minuten bei 13000U/min und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand wurde mit 750µl 2-Propanol versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 20 Minuten bei 13000U/min und Raumtemperatur. Das Pellet wurde danach mit 250µl 70%-tigem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 100µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.4. Arbeiten mit DNA

3.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der *C. albicans* Transformationskassetten wurden zusammengesetzte Oligonukleotidprimer verwendet (Biomers, siehe Abschnitt 3.1.2., Tabelle 2). Für die Kassettenamplifizierung wurden jeweils 4 PCR- Ansätze zu je 50µl angesetzt. Dabei wurden jeweils 37µl Wasser, 5µl 10x PCR- Puffer, 5µl 2mM dNTP-Gemisch (Adenin, Cystein, Guanin und Thymin), je 1 µl Oligonukleotidprimer mit einer Konzentration von 10pM und je 1µl Plasmid- DNA in einen Ansatz gegeben. Zu jedem Ansatz wurde 0,5U Taq- DNA- Polymerase hinzugefügt. Puffer, Nukleinsäuren und Polymerase wurden von Genaxxon bezogen. Für alle Ampifizierungen wurde ein PCR- Programm benutzt, bei dem nach einer anfänglichen Denaturierungsphase von 4 Minuten bei 94°C 10 Zyklen mit zunächst 1 Minute bei 93°C zur Denaturierung, 1 Minute bei 45°C zur Anlagerung der Primer an die DNA sowie 5-7 Minuten bei 72°C für die Synthese folgten. Die Synthesezeit wurde je nach Größe der zu amplifizierenden Kassette festgelegt. Anschließend folgten 30 Zyklen bei denen die Temperatur für die Anlagerung der Primer auf 55°C erhöht wurde. Abschließend folgten 10 Minuten bei 72°C zur finalen Synthese. Für die Verifizierung der Transformanten wurde eine diagnostische PCR auf Zellmaterial durchgeführt. Dafür wurden jeweils PCR- Ansätze von 25µl hergestellt. Diese enthielten 18µl Wasser, je 2,5 µl 10x PCR- Puffer und 2mM Nukleinsäurengemisch und jeweils 1µl der beiden Verifizierungsprimer. Zu diesen Ansätzen wurde wenig Zellmaterial von den Kolonien zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze 3 Minuten bei 94°C inkubiert und dann 0,25U Taq- DNA- Polymerase pro Ansatz zugegeben. Das eigentliche PCR- Programm bestand aus 37 Zyklen mit 1 Minute bei 93°C, 1 Minute bei 55°C und 2-4 Minuten bei 72°C sowie nach den Zyklen eine abschließende Inkubation von 10 Minuten bei 72°C. Die Synthesezeit in den Zyklen variierte ja nach Größe des gewünschten PCR- Fragments.

3.4.2. Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA aus PCR- Reaktionen, von Plasmiden oder genomischen Ursprungs wurde mit Agarosegelen (1% Agarose in 1x TAE; 20x TAE: 0,8M Tris-Acetat pH 8,3, 10mM EDTA) durchgeführt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (0,5µg/ml) zum Agarosegel wurden die DNA- Banden unter UV- Licht sichtbar

gemacht. Als DNA- Größenstandard diente mit *PstI* gespaltene DNA des Phagen Lambda (Promega).

3.4.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA- Fragment wurde zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend unter UV- Licht sichtbar gemacht und herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

3.4.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Klonierung von DNA- Fragmenten oder zur Überprüfung von klonierten Plasmiden wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt/ M; Jena Bioscience, Jena; MBI- Fermentas, St. Leon- Rot) gespalten. Die entsprechenden Ionenbedingungen wurden durch die Puffer der Hersteller gewährleistet.

3.4.5. Ligation

Mit Hilfe der Ligation wurden 2 DNA- Fragmente kovalent verbunden, so dass ein zirkuläres Plasmid entstand. Dabei wurde die T4- DNA- Ligase (Promega) verwendet. Die Ligationsansätze wurden für 16h bei 5°C inkubiert. Die erforderlichen Ionenbedingungen wurden durch die Puffer des Herstellers gewährleistet.

3.4.6. Sequenzierung

Die Sequenzierungen zur Überprüfung der konstruierten Plasmide wurde von MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

3.4.7. Herstellung der *CTA2p-lacZ*-Fusionsplasmide

Die Promotoren von *6191_CTA2* und *2661_CTA2* wurden über PCR von genomischer DNA amplifiziert. Dafür wurden Oligonukleotidprimer verwendet, die die Promotoren am 5'-Ende mit einer *KpnI*-Schnittstelle (P3B für *6191_CTA2* und AP1bnew für *2661_CTA2*) und am 3'-Ende mit einer *XhoI*-Schnittstelle fusionierten (P2B für *6191_CTA2*, P2A für *2661_CTA2*). Auf diese Weise wurden 500bp des *6191_CTA2*-Promotors und 1140bp des *2661_CTA2* amplifiziert und nach Angaben des Herstellers in pDrive kloniert (Qiagen). Aus dem Plasmid pDrive-*6191_CTA2p* wurde der Promotor des *CTA2*-Gens mit *KpnI/XhoI* entfernt und über die gleichen Schnitte in das

Plasmid pAU36 (Uhl und Johnson, 2001, Tabelle 3) eingesetzt, wobei die 500bp des 6191_CTA2-Promotors den *CaACT1*-Promotor ersetzten. Das damit erzeugte Plasmid pAU-6191_CTA2p-lacZ (Tabelle 3) wurde mit *KpnI* linearisiert und in verschiedene *C. albicans* Stämme transformiert. Die Integration wurde über Verifizierungs-PCR nachgewiesen. Im Plasmid pDrive-2661_CTA2p wurde in der Sequenz des Promotors ein vorher nicht verzeichneter *KpnI*-Schnitt festgestellt. Deswegen wurde das *StlacZ*-Gen aus dem Plasmid pAU36 über *PstI/BamHI* herausgeschnitten und in das pDrive-Plasmid eingesetzt, resultierend in pDrive-2661_CTA2p-lacZ. Das *CaURA3*-Gen wurde anschließend über *NotI* aus pFA-URA3 (Tabelle 3) entfernt und über in die *NotI*-Schnittstellen von pDrive-2661_CTA2p-lacZ in das Plasmid eingebaut, womit pDrive-2661_CTA2p-lacZ-URA3 entstand (Tabelle 3). Dieses Plasmid wurde mit *SphI* linearisiert und in *C. albicans* transformiert. Auch in diesem Fall wurde die Integration über Verifizierungs-PCR nachgewiesen.

3.4.8. Herstellung der CTA2p-URA3-Fusionsplasmide

Zur Fusion des *CaURA3*-Gens mit den Promotoren der *CTA2*-Gene wurden die Plasmide pDrive-6191_CTA2p und pDrive-2661_CTA2p verwendet. *CaURA3* wurde vom Plasmid pFA-URA mit Oligonukleotidprimern amplifiziert, welche den ORF am 5'-Ende mit einer *XhoI*-Schnittstelle (*XhoI*-URA3, Tabelle 2) und am 3'-Ende mit einer *XmaI*-Schnittstelle fusionierten (*XmaI*-URA3, Tabelle 2). Über *XhoI/XmaI* wurde *CaURA3* in die pDrive-Plasmide eingefügt, so dass es mit den Promotoren fusioniert wurde, womit die Plasmide pDrive-6191_CTA2p-*CaURA3* und pDrive-2661_CTA2p-*CaURA3* hergestellt wurden. Diese wurden mit *KpnI* linearisiert und anschließend in verschiedene *C. albicans* Stämme transformiert. Die Integration wurde über diagnostische PCR auf Zellmaterial der Transformanten nachgewiesen.

3.5. Mikroskopie

Die Mikroskopie wurde an einem vollautomatisierten Zeiss Axioplan2- Imaging- oder einem Axio-Imager-Mikroskop (Zeiss) durchgeführt. Das Mikroskop, die Fluoreszenz- und Transmissionslichtblenden sowie die MicroMax1024 CCD-Kamera (Princeton Instruments) wurden durch die Software Metamorph Version 4.6 gesteuert (Molecular Devices). Von einem ausgesuchten *C. albicans* Stamm wurde eine Kultur für mehrere Stunden in Minimalmedium angezogen. Von dieser Kultur wurden 1,5ml in ein

Eppendorfgefäß gegeben und anschließend mit Wasser gewaschen und abschließend in 1ml Wasser aufgenommen. Davon wurden 1,5µl auf einen Objektträger gegeben und mikroskopiert. Die Bilder wurden in einem Vergrößerungsbereich von 630x bis 2500x aufgenommen und mit der Metamorph 4.6 Software bearbeitet.

3.5.1. Aktinfärbung

Die Aktinfärbung wurde nach einem Protokoll von Oberholzer et al. (2002) durchgeführt. Die Zellen wurden nach der gewünschten Inkubationszeit mit Formaldehyd (Endkonzentration 3,7%) für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fixiert und nachfolgend mit 50mM Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Danach schloss sich eine zweite Fixierung mit Formaldehyd (Endkonzentration 3,7%) für eine Stunde an. Die Zellen wurden wieder mit 50mM Kaliumphosphatpuffer gewaschen, in diesem Puffer aufgenommen und mit Triton X-100 (Endkonzentration 0,1%) versetzt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend zweimal mit 1x PBS II (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und nachfolgend in 100µl 1x PBS II aufgenommen. Abschließend wurde 1µl Rhodamin-Phalloidin (20U/ml, Molecular Probes) zu den Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde bei 4°C im Dunkeln für mindestens 12h inkubiert und anschließend mikroskopiert. Dafür wurde der TRITC- Filter des Axioplan II-Mikroskops benutzt. Um die gefärbten Aktinstrukturen im Mikroskop besser zu sehen, wurden die Zellen in einem Mounting Medium aufgenommen. Basierend auf einem Protokoll für *S. cerevisiae* (Adams und Pringle, 1984) wurden 20mg p- Phenylendiamin in 2ml 1x PBS II im Dunkeln gelöst und zu dieser Lösung wurden anschließend 18ml 50% Glycerin gegeben. Dieses Medium wurde bei -80°C im Dunkeln aufbewahrt.

3.5.2. Chitinfärbung

Für die Untersuchung der Septierung wurden die Zellen mit Calcofluor (1mg/ml) angefärbt. Dafür wurde zu 100µl Zellen 1µl Calcofluor gegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen mikroskopiert. Dafür wurde das Calcofluor/DAPI-Filterset verwendet.

3.5.3. Mikroskopie mit Fluoreszenzproteinen

Zur Untersuchung von GFP- markierten Proteinen und den Venus- YFP- Konstrukten mit verschiedenen Promotoren wurden die Zellen zunächst in Minimalmedium für 4-

16h angezogen und anschließend mikroskopiert. Dafür wurden die Filtersets für EGFP, narrow-band-EGFP und YFP benutzt.

3.5.4. Anfärbung des Spitzenkörpers

Für die Spitzenkörperfärbung von *C. albicans* Hyphen wurden 500µl der Kultur abgenommen und mit Wasser gewaschen. Danach wurde 1µl FM4-64 (0,2µg/ml) zugeben, der Ansatz gut gemischt und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde sofort mikroskopiert.

3.5.5. Vakuolenfärbung

Die stationär angewachsene Kultur eines ausgewählten *C. albicans* Stammes wurde mit frischem Minimalmedium 1:20 verdünnt. Zum Medium wurden 2µl FM4-64 (0,2µg/ml) pro ml Kultur gegeben. Vor der Mikroskopie wurde diese Kultur unter den gewünschten Bedingungen für 3 bis 4h im Dunkeln schüttelnd inkubiert.

3.5.6. Zeitraffermikroskopie (durchgeführt von Andrea Walther)

Für die Zeitraffermikroskopie wurden Zellen der zu untersuchenden *C. albicans* Stämme nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Kleine Mengen der Zellsuspension (1-2µl) wurden auf mit Agar gefüllte Objektträger gegeben und wie früher beschrieben mikroskopiert (Walther und Wendland, 2004)

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Molekulare Analyse der *C. albicans* Formingene *BNII* und *BNRI*

4.1.1. Domänenstruktur der Formine und phylogenetische Einordnung

In der veröffentlichten Genomsequenz von *C. albicans* konnten zwei Homologe des Formins ScBni1 von *S. cerevisiae* identifiziert werden. *CaBNII* wird als ORF 19.4927 annotiert und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 1732 Aminosäuren. Das Gen *CaBNRI* wird als ORF 19.7537 annotiert und kodiert für ein Protein von 1485 Aminosäuren. Zum Erstellen der Domänenstruktur aus der Aminosäuresequenz wurde die PFAM Protein-Familien-Datenbank des Sanger-Instituts (Bateman et al., 2004; www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) und der Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Forminen aus den Ascomyceten *S. cerevisiae* und *A. gossypii* benutzt. Die Formine von *C. albicans* bestehen aus den folgenden Domänen: einer N-terminalen G-Protein-Bindedomäne (GBD), den Formin-Homologie-Regionen FH1, FH2 und FH3, einer C-terminalen Bud6-Bindedomäne (BBD) und einer Dia-autoregulatorischen Domäne (DAD). Zusätzlich weist CaBni1 eine Spa2-Bindedomäne (SBD) auf (Tabelle 4, Abbildung 1). Sowohl CaBni1 als auch CaBnr1 zeigten bei der FH2-Domäne die größten Aminosäureidentitäten zu ihren Homologen aus *A. gossypii* und *S. cerevisiae* (Abbildung 1). Auch die prolinreiche FH1-Domäne ist zwischen den Forminhomologen hochkonserviert (Abbildung 1A, B). Für die FH3-Domäne konnte für CaBni1 eine Aminosäureidentität von 28 und 29% zu den ScBni1 und AgBni1 festgestellt werden. Diese Domäne liegt zwischen G-Protein-Bindedomäne (GBD) und Spa2-Bindedomäne (SBD) (Abbildung 1A). Die Lage der FH3-Domäne bei den Bnr1-Homologen ist verschieden. Während sie bei AgBnr1 und ScBnr1 mit der GBD überlappt, liegt sie bei CaBnr1 hinter der GBD. Mit 12% ist die Aminosäureidentität der CaBnr1-FH3-Domäne zu den FH3-Domänen der beiden anderen Bnr1-Homologen sehr niedrig (Abbildung 1B). Für die G-Protein-Bindedomäne von CaBni1 konnte eine höhere Übereinstimmung mit der entsprechenden Domäne von AgBni1 als mit ScBni1 festgestellt werden. (Abbildung 1A). Im Gegensatz dazu besteht bei den Bnr1-Homologen eine höhere Aminosäureidentität zwischen den GBD von ScBnr1 und CaBnr1 als zwischen CaBnr1 und AgBnr1 (Abbildung 1B).

Tabelle 4. Position der einzelnen Domänen in den Aminosäuresequenzen von CaBni1 und CaBnr1.

Domäne	Position in CaBni1	Position in CaBnr1
G-Protein-Bindedomäne	110-303	109-393
FH3-Domäne	358-570	397-655
Spa2-Bindedomäne	686-873	keine
FH1-Domäne	1042-1113	847-942
FH2-Domäne	1129-1519	954-1343
DA-Domäne	1568-1582	1395-1409
Bud6-Bindedomäne	1425-1732	1249-1485

Wie die Bni1-Homologen aus *A. gossypii* und *S. cerevisiae* weist CaBni1 eine Spa2-Bindedomäne aus, die sich zwischen FH3 und FH1 befindet (Abbildung 1A, Tabelle 4). Die SBD von CaBni1 besitzt zu den entsprechenden Domänen von AgBni1 und ScBni1 eine Aminosäureidentität von 32% (Abbildung 1A). Entsprechend den bekannten Bud6-Bindedomänen der *S. cerevisiae* Formine konnten auch bei CaBni1 und CaBnr1 C-terminale Domänen identifiziert werden, die mindestens 25% Aminosäureidentität zu den Bud6-Bindedomänen der anderen Formine zeigten (Tabelle 4, Abbildung 1A, B). Für die Funktion der Formine ist die Existenz einer Dia-autoregulatorischen Domäne (DAD) von großer Bedeutung. Anhand der bekannten DAD aus ScBni1 wurden in AgBni1 und CaBni1 diese Domänen identifiziert. Die DAD von CaBni1 ist zu jeweils 60% identisch zu den entsprechenden Regionen in ScBni1 und AgBni1 (Abbildung 1A) und entspricht auch der von Alberts (2001) festgelegten Konsensussequenz und zeigt große Übereinstimmungen zu den DAD des Formins Diaphanous aus *Drosophila melanogaster* und dem *Aspergillus nidulans* Formin SepA (Abbildung 2). Anhand dieser Konsensussequenz konnte auch für CaBnr1 eine DAD festgelegt werden, was einen Unterschied zu den Bnr1-Homologen von ScBnr1 und AgBnr1, einem der beiden Bnr1-Homologen in *A. gossypii*, darstellt (Abbildung 2). Diese DAD zeigt zwar mit 25% zu AgBnr1 und 33% zu ScBnr1 eine relativ hohe Konservierung (Abbildung 1B), allerdings wichen die Domänen von ScBnr1 und AgBnr1 im Gegensatz zu CaBnr1 sehr stark von der Konsensussequenz ab (Abbildung 2).

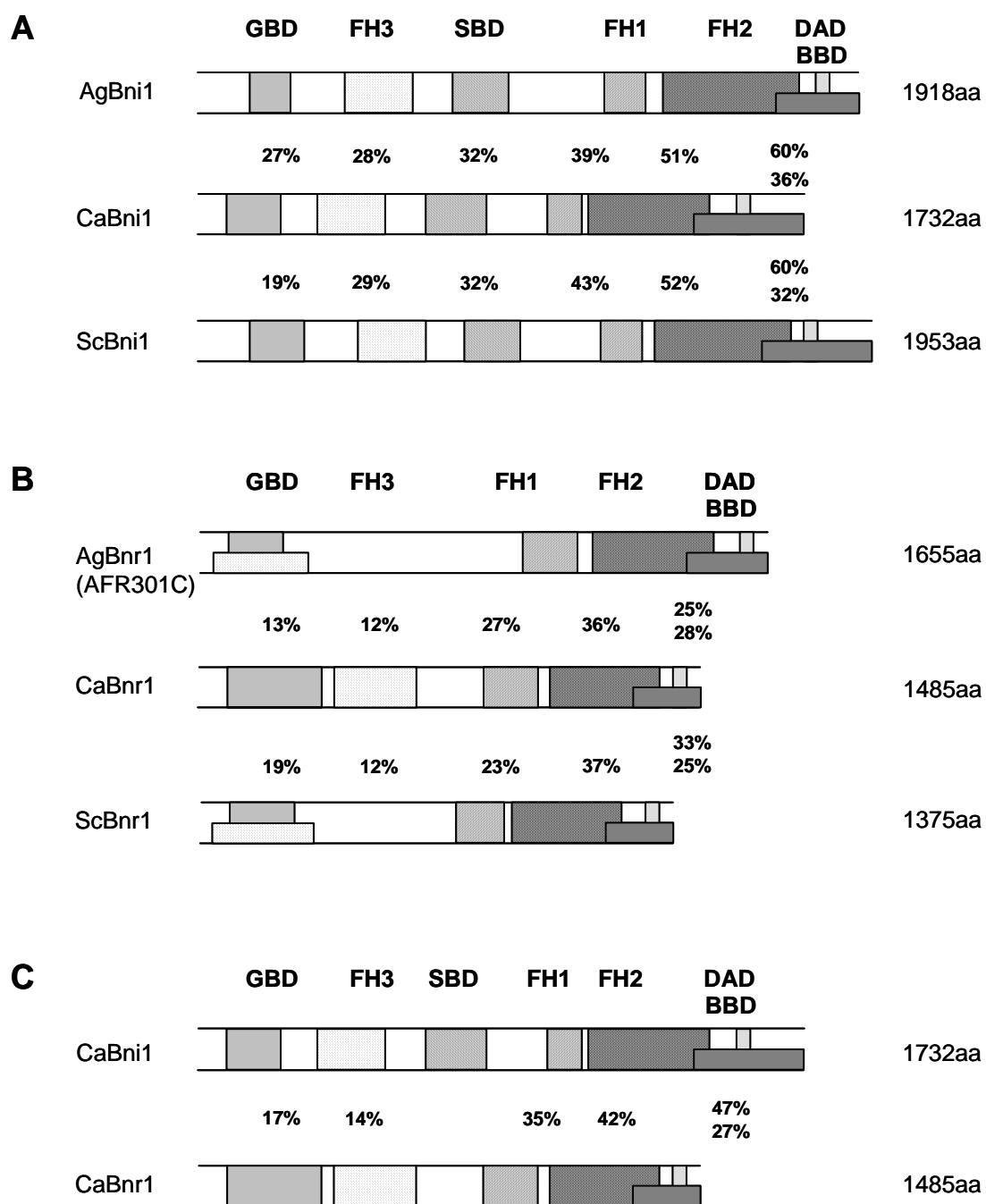


Abbildung 1. Vergleich der Aminosäureidentitäten von Formin-Homologen der Ascomyceten *Ashbya gossypii*, *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae*. Es werden jeweils die Aminosäureidentitäten für die einzelnen Domänen in Prozent angezeigt. (A) Vergleich der Bni1-Homologen. (B) Vergleich der Bnr1-Homologen. Für den Vergleich wurde eines der beiden fast identischen Bnr1-Homologen in *A. gossypii* verwendet (C) Vergleich von CaBni1 und CaBnr1

Konsensus	GVMDXLLLEXLKXGSA
	AA R AGP
	Q A
Diaphanous	GVMDSLLEALQTGSA
ScBni1	AVMDKLLEQLKNAGP
ScBnr1	LLISKLRFEVKKDPEP
AnSepA	GAMDSLLEKLRAAAP
CaBni1	GVMDSLQLRLKAAAP
CaBnr1	AVIDSLLEKLKSSTP

Abbildung 2. Darstellung der Sequenz von Dia-autoregulatorischen Domänen verschiedener Formine im Vergleich zu einer Konsensussequenz nach Alberts (2001).

Beim Vergleich der beiden *C. albicans* Formine untereinander zeigten die Dia-autoregulatorische Domäne mit 47%, und die FH2-Domäne mit 42% die höchsten Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz (Abbildung 1C). Vorallem im Bereich der GBD und der FH3 gab es nur geringe Aminosäureidentitäten (Abbildung 1C). Insgesamt lagen die Übereinstimmungen immer unter 50%. Diese Untersuchungen zeigten, dass CaBni1 näher mit seinen Homologen aus *A. gossypii* und *S. cerevisiae* verwandt ist, als mit dem anderen *C. albicans* Formin CaBnr1. Auch CaBnr1 zeigte engere verwandtschaftliche Beziehungen zu AgBnr1 und ScBnr1 als zu CaBnr1. Diese Ergebnisse werden durch einen phylogenetischen Stammbaum veranschaulicht, der die Aufteilung der untersuchten Formine in eine Bni1-Gruppe und eine Bnr1-Gruppe zeigt (Abbildung 3).

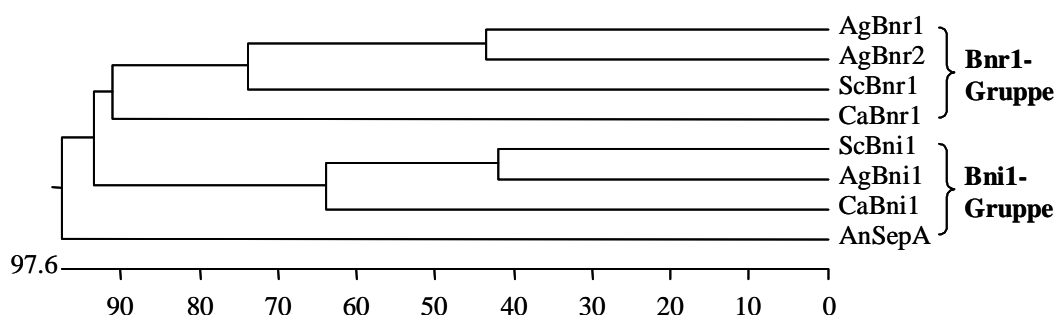


Abbildung 3. Phylogenetischer Stammbaum von Forminen innerhalb der Ascomyceten. Der Stammbaum wurde aus den Proteinsequenzen der angezeigten Formine mit Hilfe der DNASTAR-Software erzeugt.

4.1.2. Verlangsamtes Wachstum der Formindeletionsmutanten

Für die Funktionsanalyse von *BNI1* und *BNR1* in *C. albicans* wurden die ORFs der beiden Gene komplett deletiert, resultierend in den lebensfähigen Stämmen GC14 (*bni1::URA3/bni1::HIS1*) und GC19 (*bnr1::URA3/bnr1::HIS1*). Um die Auswirkungen

der Gendeletion auf die Wachstumsgeschwindigkeit zu untersuchen, wurden mit homozygoten Mutanten, dem Wildtyp SC5314, dem Transformationsausgangsstamm BWP17 und den beiden heterozygoten Mutanten GC11 (*BNI1/bni1::URA3*) und GC13 (*BNR1/bnr1::URA3*) eine Wachstumskurve erstellt. Dafür wurden Zellen der Stämme für 10h in YPD bei 30°C angezogen und alle 30 Minuten die optische Dichte bei 600nm gemessen. Aus diesen Wachstumskurven wurden anschließend die Verdopplungszeiten für die jeweiligen Stämme berechnet (Tabelle 5). Für den Wildtypstamm SC5314 wurde dabei eine Verdopplungszeit von 71 Minuten ermittelt. Mit 98 Minuten wies der Transformationsstamm BWP17, bei dem die Gene *ARG4*, *HIS1* und *URA3* deletiert sind, ein sehr langsames Wachstum auf (Tabelle 5). Die beiden Heterozygoten, die zwar das *URA3*-Gen besitzen, denen jedoch immer noch *ARG4* und *HIS1* fehlten, wiesen höhere Verdopplungszeiten als der Wildtyp auf und lagen bei 79 Minuten für GC13 und 86 Minuten für GC11 (Tabelle 5). Die beiden Homozygoten wuchsen ebenfalls deutlich langsamer als der Wildtyp. Die *bni1*-Homozygote GC14 hatte eine Verdopplungszeit von 92 Minuten, nicht sehr viel mehr als die *BNI1/bni1*-Heterozygote GC11 mit 86 Minuten (Tabelle 5). Die Deletion von *BNR1* führte im Stamm GC19 zu einer Verdopplungszeit von 99 Minuten und damit zu einem Wachstum ähnlich dem von BWP17. Die Verdopplungszeit der Homozygoten war damit um 20 Minuten höher als die der Heterozygoten GC13 (Tabelle 5).

Tabelle 5. Verdopplungszeiten von *C. albicans* während der Hefephase

Stamm	Verdopplungszeit in Minuten
SC5314	71 ± 7
BWP17	98 ± 11
<i>BNI1/bni1</i> (GC11)	86 ± 17
<i>bni1/bni1</i> (GC14)	92 ± 15
<i>BNR1/bnr1</i> (GC13)	79 ± 12
<i>bnr1/bnr1</i> (GC19)	99 ± 14

Die Verdopplungszeiten der einzelnen Stämme wurde aus den Anstiegen der Wachstumskurven errechnet: $td = \ln 2 \cdot (tx_2 - tx_1) / (\ln x_2 - \ln x_1)$. Dafür wurden die OD-Werte zweier verschiedener Zeitwerte (x_1 , x_2) im linearen Bereich der Kurve verwendet. Die Berechnungen wurden für 5 verschiedene Zahlenpaare der jeweiligen Kurven durchgeführt. Aus den damit ermittelten Verdopplungszeiten wurde der angegebene Mittelwert errechnet.

4.1.3. Untersuchungen zur Zellmorphologie der Formindeletionsmutanten während der Hefephase

Um die Auswirkungen der Deletion von *CaBNI1* bzw. *CaBNR1* genauer festzustellen, wurde die Zellmorphologie während des Hefe- und des Hyphenwachstums untersucht. Dabei wurden jeweils der *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 und die homozygoten

Mutanten GC14 (*bni1::URA3/bni1::HIS1*) und GC19 (*bnr1::URA3/bnr1::HIS1*) miteinander verglichen. Zunächst wurden Zellen der drei untersuchten Stämme für 12 h in Minimalmedium bei 30°C angezogen und anschließend mit Calcofluor gefärbt. Bei der Untersuchung der Zellmorphologie konnte festgestellt werden, dass die *bni1/bni1* Zellen sehr viel breiter waren als vergleichbare Wildtypzellen (Abbildung 4). Diese Beobachtung konnte durch die Vermessung der Zellen bestätigt werden (Tabelle 6). Bei Wildtypzellen mit einer durchschnittlichen Länge von 6,0µm und einer durchschnittlichen Breite von 4,6µm konnte ein Länge- Breite- Index von 1,3 berechnet werden (Tabelle 6). Im Gegensatz dazu betrug bei Zellen der untersuchten *bni1/bni1* Homozygoten der Länge- Breite- Index nur 1,1. Dieses Ergebnis war im wesentlichen auf die starke Verbreiterung der Zellen (durchschnittlich 5,7µm, Tabelle 6) zurückzuführen. Die Zellen waren mit durchschnittlich 6,4µm auch länger als Wildtypzellen, wobei die Unterschiede in der Länge nicht so stark waren wie bei der Breite. Durch diese Verbreiterung bekamen die *bni1/bni1* Zellen eine rundliche Gestalt im Vergleich zur ellipsoiden Form der Wildtypzellen (Abbildung 4). Auch die Deletion von *CaBNR1* führte in der homozygoten Mutante zu einer veränderten Morphologie der Hefezellen. Die Zellen des *bnr1/bnr1* Stammes waren mit einer Länge von 6,7µm wesentlich länger als vergleichbare Wildtypzellen (Tabelle 6), wobei es aber im Gegensatz zur *bni1/bni1*- Mutante nicht zu einer Verbreiterung der Zellen kam, mit einer Durchschnittsbreite von 3,9µm waren die Zellen schmaler als vergleichbare Wildtypzellen (Tabelle 6). Mit einem Länge- Breite- Index von 1,7 konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *CaBNR1* zu stärker polarisiertem Wachstum der Zellen und dadurch zu einer elongierten Form der Hefezellen führte (Abbildung 4).

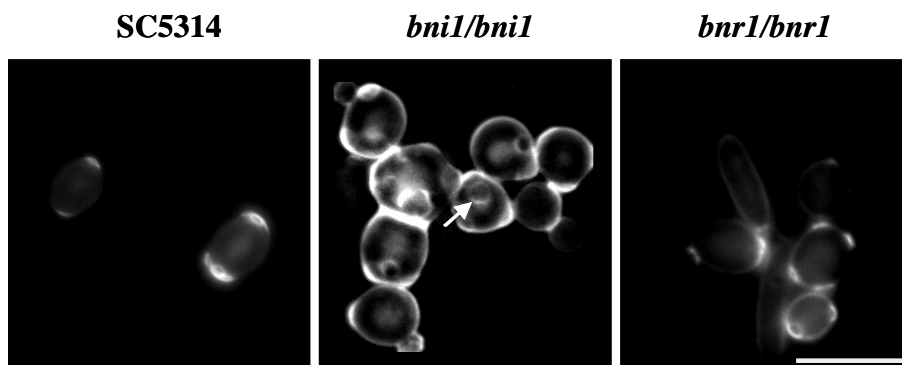


Abbildung 4. Morphologie nach 12h in Minimalmedium bei 30°C
Calcofluorfärbung der Zellen. Der Pfeil zeigt eine Knospungnarbe einer *bni1/bni1*- Zelle.
Größenbalken: 10µm

Tabelle 6. Vermessung von *C. albicans* Hefezellen.

Stamm	Länge in μm	Breite in μm	Länge-Breite-Index	Durchmesser der Knospungsnarben in μm
SC5314	$6,0 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,7$	1,3	$1,5 \pm 0,3$
<i>bni1/bni1</i>	$6,4 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,4$	1,1	$2,4 \pm 0,9$
<i>bnr1/bnr1</i>	$6,7 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,4$	1,7	$1,5 \pm 0,4$

Bei der Calcofluorfärbung zeigte sich bei den Zellen der *bni1/bni1*- Mutanten, dass die Knospungsnarben, übrig gebliebene Chitinringe vergangener Zellteilungen, eine abnorme Größe aufwiesen (Abbildung 4, Pfeil). Bei der quantitativen Untersuchung wurde diese Beobachtung bestätigt. Mit einem Durchmesser von ca. $2,5\mu\text{m}$ waren die Knospungsnarben der *bni1/bni1* Zellen um etwa 67% größer als das bei den Zellen von SC5314 und der *bnr1/bnr1* Mutanten der Fall war, die beide jeweils einen durchschnittlichen Knospungsnarbendurchmesser von $1,5\mu\text{m}$ zeigten (Tabelle 6).

4.1.4. Die Deletion von *CaBNII* verursacht Defekte bei der Aufrechterhaltung des polaren Hyphenwachstums

Nach den Untersuchungen zur Zellmorphologie erfolgte die Analyse des Wachstums unter Hypheninduktionsbedingungen. Dafür wurden der *C. albicans* Wildtyp SC5314, die *bni1/bni1*-Mutante GC14 und die *bnr1/bnr1*-Homozygote GC19 verwendet. Zunächst wurde das Verhalten der Stämme unter Induktionsbedingungen in Flüssigminimalmedium mit 10% Serum überprüft. Nach 3h bei 37°C zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *bni1/bni1*-Mutante. Während Zellen von SC5314 lange und schmale Hyphen ausbildeten, konnten sich aus *bni1/bni1*-Zellen nur Hyphen bilden, die kürzer waren und auch eine wesentlich größere Breite aufwiesen. Dieser Phänotyp geschwollener Hyphen konnte durchgehend beobachtet werden (Abbildung 5). Die Deletion des *BNR1*-Gens führte im Gegensatz zu den *bni1/bni1*-Mutanten zu keinen offensichtlichen Defekten während des Hyphenwachstums. Die Hyphen der *bnr1/bnr1*-Mutante waren ebenfalls schlank und lang, ähnlich den Wildtyphyphen (Abbildung 5).

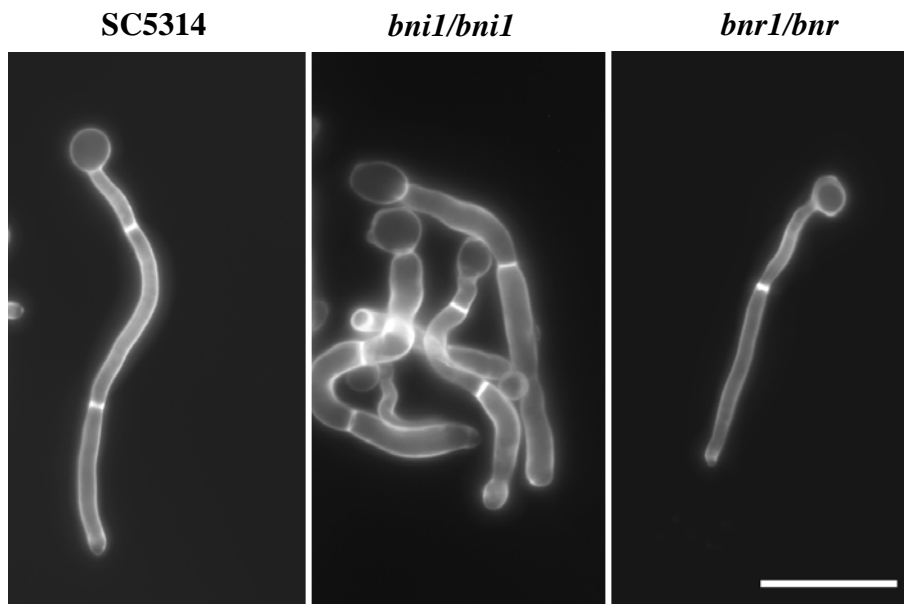


Abbildung 5. Hyphenwachstum von *C. albicans*.

Zellen der angezeigten Stämme wurden für 3h in Minimalmedium mit 10% Serum bei 37°C inkubiert, danach mit Calcofluor gefärbt und anschließend mikroskopiert. Größenbalken: 10µm

Um den Eindruck der geschwollenen Hyphen einer *bni1/bni1*-Mutante zu bestätigen, wurden von SC5314, *bnr1/bnr1*- und *bni1/bni1*-Homozygote von je 100 Hyphen die Länge und die Breite bestimmt (Tabelle 7). Dabei wurde für den Wildtyp nach 3h eine durchschnittliche Hyphenlänge von 50,8µm und eine Hyphenbreite von 2,4µm ermittelt. Diese Werte ergaben für SC5314 einen Länge-Breite-Index von 21,7 (Tabelle 7). Für die *bnr1/bnr1*-Mutante ergab die Vermessung ähnliche Werte, die mit 48,9µm Länge und 2,3µm Breite nur geringfügig von den untersuchten Wildtypyphen abwichen. Das spiegelte sich auch im Länge-Breite-Index für *bnr1/bnr1*-Hyphen wider, der mit 21,2 ähnlich hoch war wie bei SC5314 (Tabelle 7). Wie bereits in Abbildung 6 zu sehen war, wichen die Länge der *bni1/bni1*-Hyphen deutlich von denen der anderen Stämme ab. Mit durchschnittlich 39,5µm waren die Hyphen der Mutante um etwa ein Fünftel kürzer als die des Wildtyps. Im Gegensatz dazu, wiesen die Hyphen eine deutliche Zunahme der Breite aus, die mit durchschnittlich 3,7µm wesentlich höher war als bei SC5314 oder dem *bnr1/bnr1*-Stamm. Diese Werte resultierten für die *bni1/bni1*-Hyphen in einem Länge-Breite-Index von 10,7 (Tabelle 7). Damit war dieser Index bei der Mutante lediglich halb so groß wie beim Wildtyp, was die mikroskopischen Beobachtungen bestätigt.

Tabelle 7. Vermessung der Hyphen von *C. albicans* Stämmen nach einer Inkubation von 3h in Flüssigminimalmedium mit 10% Serum bei 37°C.

Stamm	Länge (n=100)	Breite (n=100)	Länge-Breite-Index (n=100)
SC514	50,8 ± 6,1	2,4 ± 0,2	21,7
<i>bnr1/bnr1</i>	48,9 ± 7,4	2,3 ± 0,3	21,2
<i>bni1/bni1</i>	39,5 ± 5,1	3,7 ± 0,6	10,7

Um die Ergebnisse der Untersuchungen in Flüssigmedium zu bestätigen, wurden von den drei Stämmen Zeitraffermikroskopieaufnahmen angefertigt. Dabei wurde das Verhalten der Stämme auf Minimalagar mit 10% Serum bei 37°C über einen Zeitraum von 10h analysiert. Bei allen drei Stämmen wurden Einzelzellen als Ausgangsmaterial genommen (Abbildung 6 0h). Nach 2h zeigten sowohl der Wildtyp als auch die *bnr1/bnr1*-Mutante die Ausbildung von Hyphenschläuchen. Im Vergleich dazu bildete die *bni1/bni1*-Mutante eine wesentlich kürzere und dickere Ausstülpung (Abbildung 6 2h). Nach 4h konnten bei SC514 und der *bnr1/bnr1*-Mutante deutliche Hyphen festgestellt werden. Die *bni1/bni1*-Mutante hingegen bildete nur kurze und angeschwollene Hyphenschläuche aus (Abbildung 6 4h). Nach 6h bildeten sich sowohl bei SC514 als auch bei der *bnr1/bnr1*-Mutante aus den ursprünglichen Keimzellen neue Hyphen und auch die bereits gebildeten Hyphen zeigten neue Seitenverzweigungen und ein deutliches Längenwachstum, welches sich bis zum Ende der Aufnahmen fortsetzte, so dass sich bei beiden Stämmen ein dichtes Myzel aus Hyphen bildete (Abbildung 6, 6-10h). Die *bni1/bni1*-Mutante bildete zwar auch neue Ausstülpungen, diese wiesen jedoch kein nennenswertes Längenwachstum auf. Auch die primären Keimschläuche konnten nicht wesentlich an Länge zunehmen und wuchsen lediglich in der Breite. Auch die Spitzenregionen waren im Gegensatz zu Wildtyp und *bnr1/bnr1*-Mutante eher breit und weniger polarisiert. Nach 10h bildete die *bni1/bni1*-Mutante kein Myzel aus (Abbildung 6, 6-10h).

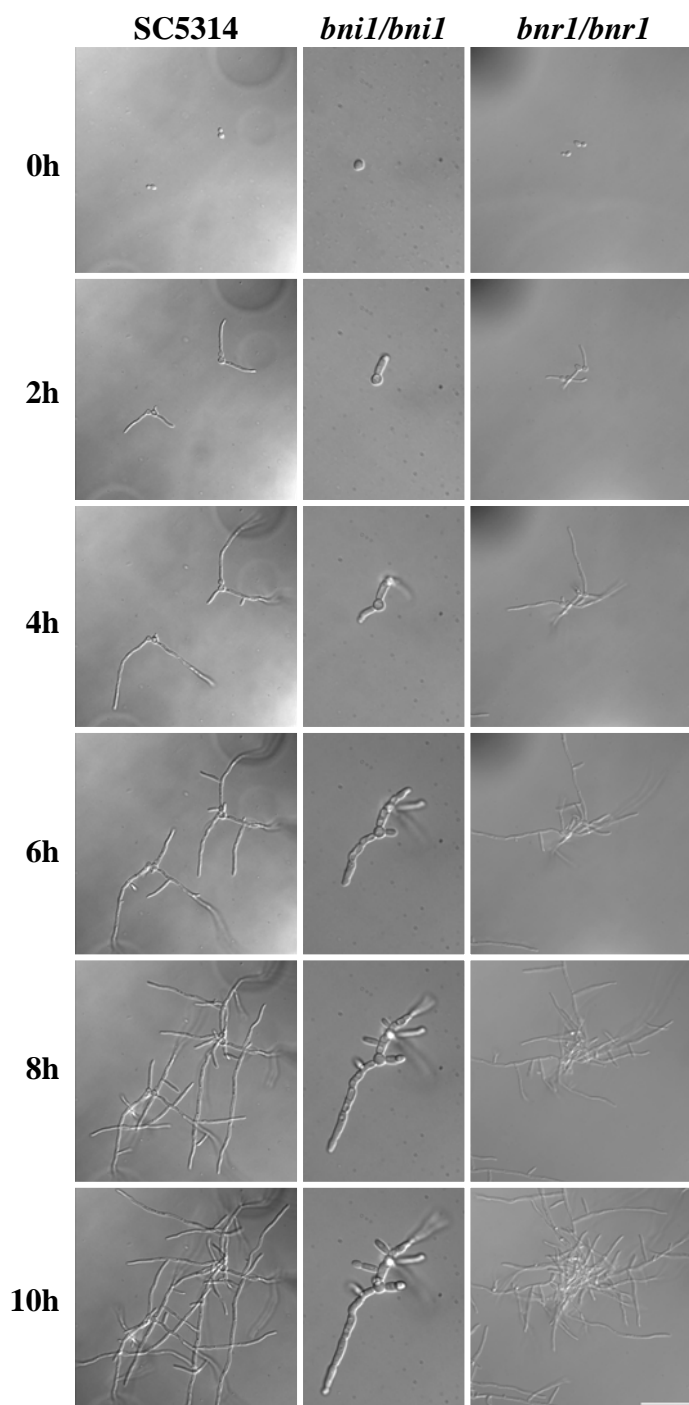


Abbildung 6. Zeitrafferaufnahmen vom Hyphenwachstum verschiedener *C. albicans* Stämme. Die Zellen von SC5314 und den *bni1/bni1*- und *bnr1/bnr1*-Homozygoten wurden auf CSM-Agar mit 10% Serum für 10h bei 37°C inkubiert. Alle 3 Minuten wurden von den Zellen Fotoaufnahmen gemacht. Größenbalken: 50µm

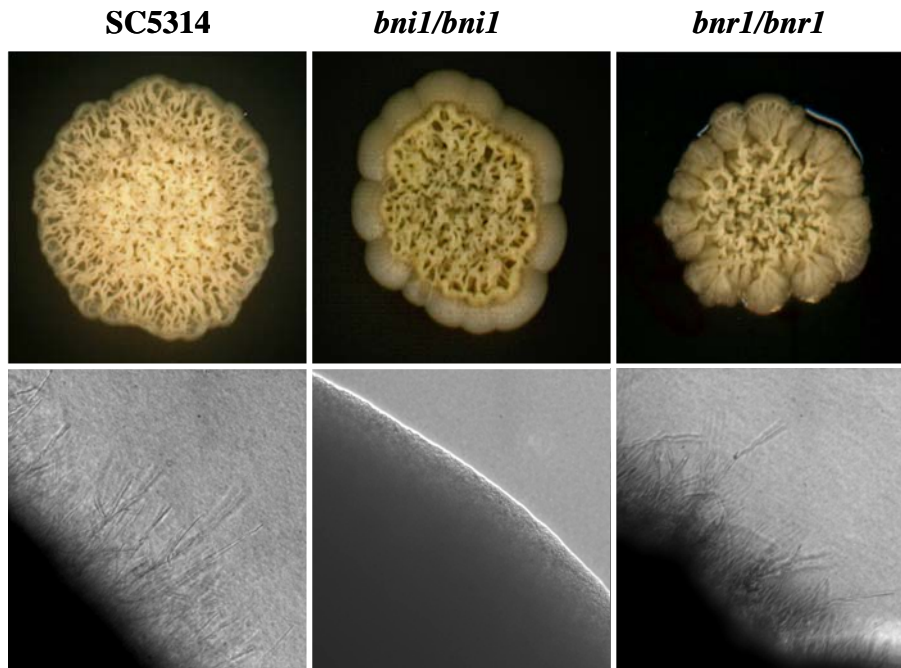


Abbildung 7. Hyphenwachstum auf Festmedien

Zellen der angegebenen Stämme wurden auf Agarplatten mit Minimalmedium und 10% Serum aufgetropft und für 4 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend fotografiert.

Für eine langfristige Analyse des Hyphenwachstums wurden der Wildtypstamm SC5314 und die beiden Formindeletionsmutanten auf festem Minimalmedium mit 10% Serum inkubiert. Nach 4 Tagen bei 37°C wies SC5314-Kolonie eine stark zerfurchte Oberfläche auf. Am Rand der Kolonie wurden Hyphen sichtbar, die in den Agar hineinwuchsen (Abbildung 7). Eine ähnliche Kolonienmorphologie konnte für die *bnr1/bnr1*-Homozygote festgestellt werden. Auch hier konnten eine zerfurchte Kolonienoberfläche und Hyphen am Kolonienrand beobachtet werden (Abbildung 7). Im Gegensatz dazu wies die *bni1/bni1*-Mutante einige Unterschiede auf. Obwohl auch hier die Kolonienoberfläche stark zerfurcht war, zeigte sich schon bei der Oberfläche eine Abglättung der Kolonienränder. Auch bei der mikroskopischen Untersuchung konnten keine Hyphen an den Rändern der Kolonie beobachtet werden. Somit konnten die Defekte beim Hyphenwachstum ohne funktionelles Bni1 auch nach längeren Wachstumsphasen nachgewiesen werden.

4.1.5. Untersuchungen zum Aktinzytoskelett

Um die Bedeutung der Formine für die Herstellung von Aktinfilamenten in *C. albicans* zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Rhodamin-Phalloidin das Aktinzytoskelett im Wildtypstamm SC5314, der *bni1/bni1*-Mutante GC14 und der *bnr1/bnr1*-Mutante GC19 angefärbt und analysiert. Zunächst wurden Hefezellen der betreffenden *C. albicans* Stämme nach einer dreistündigen Inkubation bei 30°C untersucht. Dabei zeigte sich für den Wildtyp SC5314, dass sich die verzweigten Aktinfilamente (Aktinpatches) immer an den Stellen des polaren Wachstums in der Spitze der entstehenden Tochterzelle konzentrierten (Abbildung 8A). Dabei konnte auch beobachtet werden, dass sich nach der Ausbildung des Aktinrings, der notwendig für die Zytokinese ist, die Aktinpatches gleichmäßiger in der Tochterzelle verteilen, so dass isotropes Wachstum möglich ist. In den Mutterzellen wurden nur wenig Aktinpatches. Sowohl in der Mutter- als auch in der Tochterzelle konnten die linearen Aktinfilamente (Aktinkabel) sichtbar gemacht werden. In den Mutterzellen waren die Aktinkabel besser zu sehen, als in den Tochterzellen, was aber auf das Fehlen Aktinpatches zurückzuführen ist, die die Aktinkabel zum Teil überdeckten (Abbildung 8A). Bei der homozygoten *bni1/bni1*-Mutante konnten ebenfalls Aktinpatches an den Stellen des polaren Wachstums beobachtet werden. Ihre Verteilung war dem Wildtyp entsprechend so, dass sich die Aktinpatches fast ausschließlich in der Spitze der Tochterzelle konzentrierten. Auch in diesem Stamm konnte der Aktinring sichtbar gemacht werden. In Zellen mit Aktinring zeigte sich wieder die eher gleichmäßige Verteilung der Aktinpatches in der Tochterzelle. Die Aktinkabel konnten auch im Hintergrund einer *BNII*-Deletion beobachtet werden und wurden sowohl in den Mutter- als auch den Tochterzellen gefunden (Abbildung 8A). Auch in den Hefezellen der *bnr1/bnr1*-Mutante konnten die Aktinpatches sichtbar gemacht werden und auch in diesen Zellen waren die Patches in den Regionen des polaren Wachstums, den Spitzen der Tochterzellen, konzentriert. Aktinkabel konnten ebenfalls sichtbar gemacht werden, allerdings zeigte sich dabei, dass in den untersuchten Zellen nur sehr wenige Aktinkabel in den Mutterzellen gefunden werden konnten. Diese Beobachtung unterschied sich deutlich von den Ergebnissen für SC5314 und die *bni1/bni1*-Homozygote (Abbildung 8A).

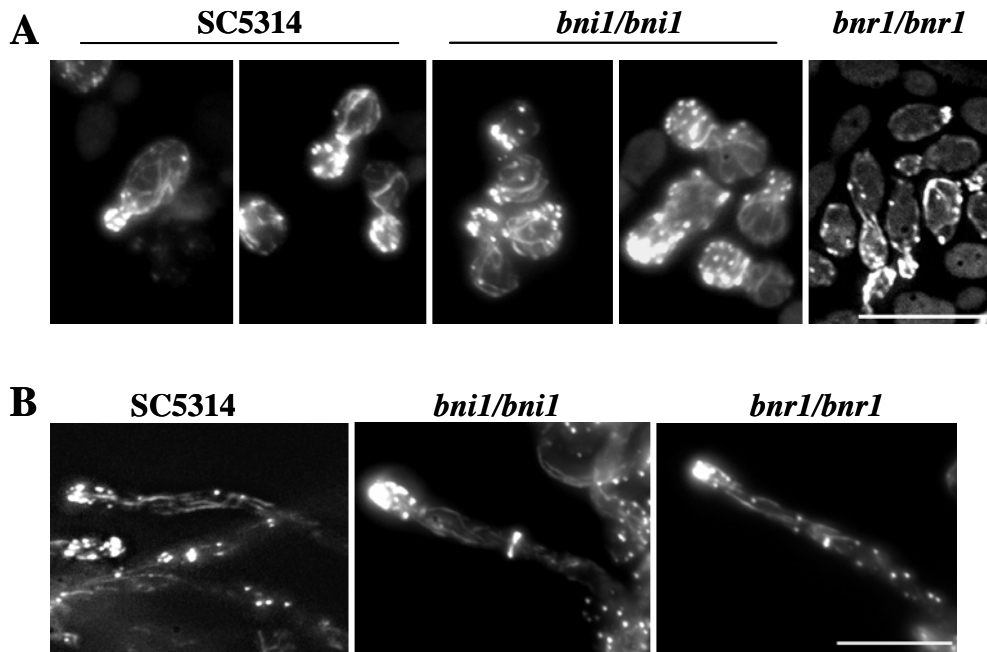


Abbildung 8: Untersuchung des Aktinzytoskeletts in *C. albicans*.

Zellen der angegebenen Stämme wurden für 3h in CSM-Medium bei 30°C (A) oder für 3h in CSM-Medium mit 10% Serum bei 37°C inkubiert (B) und anschließend mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt und am nächsten Tag mikroskopiert. Größenbalken: 10µm

Nachdem bei den Untersuchungen zur Morphologie für die *bni1/bni1*-Mutante ein Defekt im polaren Hyphenwachstum gezeigt werden konnte, wurde das Aktinzytoskelett nach einer Inkubation unter Hypheninduktionsbedingungen ebenfalls mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt und untersucht. Beim Wildtypstamm SC5314 zeigte sich eine sehr starke Konzentration von Aktinpatches in der Hyphenspitze und eine Ausrichtung der Aktinkabel in Richtung der Spitzenregion (Abbildung 8B). Für die *bnr1/bnr1*-Mutante konnte ebenfalls eine Verteilung der Aktinpatches und Aktinkabel festgestellt werden, die der Wildtypsituation entsprach. (Abbildung 8B). Die *bni1/bni1*-Mutante zeigte ebenfalls Aktinpatches, die in der Hyphenspitze konzentriert waren. Es wurden ebenfalls Aktinkabel beobachtet, die vorallem im subapikalen Bereich zwischen Hyphenspitze und dem entstehenden Aktinring zu sehen waren (Abbildung 8B). Somit konnte gezeigt werden, dass weder Bni1 noch Bnr1 eine essentielle Rolle für die Ausbildung linearer Aktinkabel haben und keinen Einfluss auf die Synthese oder Verteilung der Aktinpatches besitzen.

4.1.6. Analyse von Endozytose und Vakuolenmorphologie

Neben den Untersuchungen zum polaren Wachstum sollte auch der Verlauf der Endozytose in den Mutanten ohne *BNII* oder *BNRI* untersucht werden. Dafür wurden neben diesen Mutanten auch der *C. albicans* Wildtyp SC5314 und die bereits beschriebene *C. albicans wall/wall*-Mutante CAT6 (Walther und Wendland, 2004a) untersucht. Zunächst wurden Endozytose und Vakuolenmorphologie während des Hefewachstums untersucht. Dafür wurden Zellen der jeweiligen Stämme für mindestens 10h in Minimalmedium, welches bereits den Vakuolenfarbstoff FM4-64 enthielt. Die Aufnahme von FM4-64 bedeutete, dass die Zellen in der Lage waren, Endozytose durchzuführen. Bei allen untersuchten Stämmen kam es zur Aufnahme dieses Farbstoffes in die Zellen (Abbildung 9A). Während bei den verschiedenen Stämmen in den Knospenspitzen eine Ansammlung von kleineren Vakuolen und Vesikeln zu beobachten gab, konnten Unterschiede in der Mutterzelle festgestellt werden. Typisch für den Wildtyp SC5314 war das Vorhandensein einer großen Vakuole, die einen großen Anteil des Zellvolumens einnimmt. Im Gegensatz dazu zeigte die *wall/wall*-Mutante in der Mutterzelle eine Ansammlung kleinerer Vakuolen, zeigte also einen Defekt bei der Fusion der Vakuolen (Abbildung 9A). Die *bni1/bni1*-Mutante zeigte wie der Wildtyp nur eine große Vakuole in der Mutterzelle, auch wenn diese nicht so ausfüllend war wie bei SC5314 (Abbildung 9A). Die *bnr1/bnr1*-Mutante zeigte ebenfalls keinen Defekt in der Vakuolenmorphologie, auch hier konnte eine große Vakuole in der Mutterzelle beobachtet werden (Abbildung 9A). Anschließend wurden die 4 Stämme während des Hyphenwachstums untersucht. Nach Inkubation von 3h bei 37°C in Minimalmedium mit 10% Serum und FM4-64 zeigte der Wildtyp eine Konzentration von Vesikeln in den apikalen und subapikalen Regionen der Hyphe, während die hinteren Hyphenabschnitte meist eine oder zwei große Vakuolen enthielten (Abbildung 9B). Die *bnr1/bnr1*-Mutante zeigte eine Vakuolenverteilung, die weitgehend der des Wildtyps entsprach (Abbildung 9B). Die *bni1/bni1*-Mutante war gekennzeichnet durch geschwollene Hyphen, wobei dieser Phänotyp jedoch keine Auswirkungen auf die Morphologie und Verteilung der Vakuolen hatte. Auch hier nahm die Größe der Vakuolen in den hinteren Hyphenabschnitten zu (Abbildung 9B). Im Gegensatz zu den drei anderen Stämmen zeigte die *wall/wall*-Mutante eine starke Ansammlung von Vesikeln in den apikalen Bereichen des Keimschlauchs und auch in den hinteren Abschnitten fehlten die großen Vakuolen, die beim Wildtyp und den Forminmutanten beobachtet werden konnten. Wie schon in der Hefephase war die

Mutterzelle der *wal1/wal1*-Pseudohyphen nicht von einer großen sondern von mehreren kleinen Vakuolen ausgefüllt. Der Wildtyp und die beiden Forminmutanten zeigten jeweils eine große Vakuole in den Mutterzellen (Abbildung 9B).

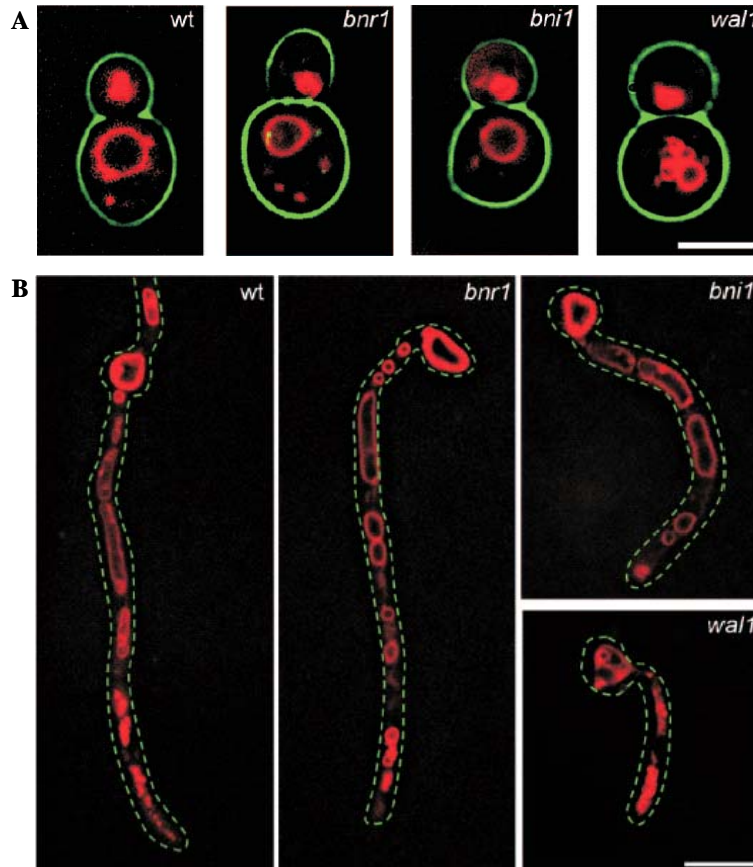


Abbildung 9. Analyse von Endozytose und Vakuolenmorphologie.

(A) Vakuolenmorphologie während des Hefewachstums. Zellen wurden über Nacht bei 30°C angezogen und gleichzeitig mit FM4-64 gefärbt. Größenbalken: 5µm.

(B) Vakuolenmorphologie während des Hyphenwachstums. Zellen wurden für 3h bei 37°C in Minimalmedium mit 10% Serum und FM4-64 inkubiert und anschließend mikroskopiert. Größenbalken: 10µm

4.1.7. Das Formin Bni1 ist Teil des Spitzenkörpers von *C. albicans*

Zur Untersuchung der Lokalisierung von Bni1 in *C. albicans* wurde das *BNII*-Gen am C-Terminus mit dem *GFP*-Gen fusioniert. Der dabei entstandene Stamm GC59 (*BNII/BNII-GFP::HIS1*) wurde anschließend untersucht. Nur in Hyphen konnte eine definierte Lokalisierung von Bni1-GFP festgestellt werden. In fast allen untersuchten Hyphen konnte ein Bni1-GFP-Signal in den Hyphenspitzen gesehen werden (96,7%, n=300, Abbildung 10). Da die Lokalisierung von Bni1-GFP der des Spitzenkörpers in anderen filamentösen Pilzen ähnelte, wurden die Hyphen des Bni1-GFP-Stammes mit

FM4-64 angefärbt. Dieser Farbstoff macht endozytotische Vesikel sichtbar. Durch eine kurze Inkubation mit FM4-64 wurde erreicht, dass nur eine spezifische Region in der Hyphenspitze gefärbt wurde. Diese Region wurde als Spitzenkörper definiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Bni1-GFP mit dem Spitzenkörper kolokalisiert (Abbildung 10). Diese Kolokalisierung wurde in fast allen untersuchten Hyphen beobachtet (94,4%, n=125).

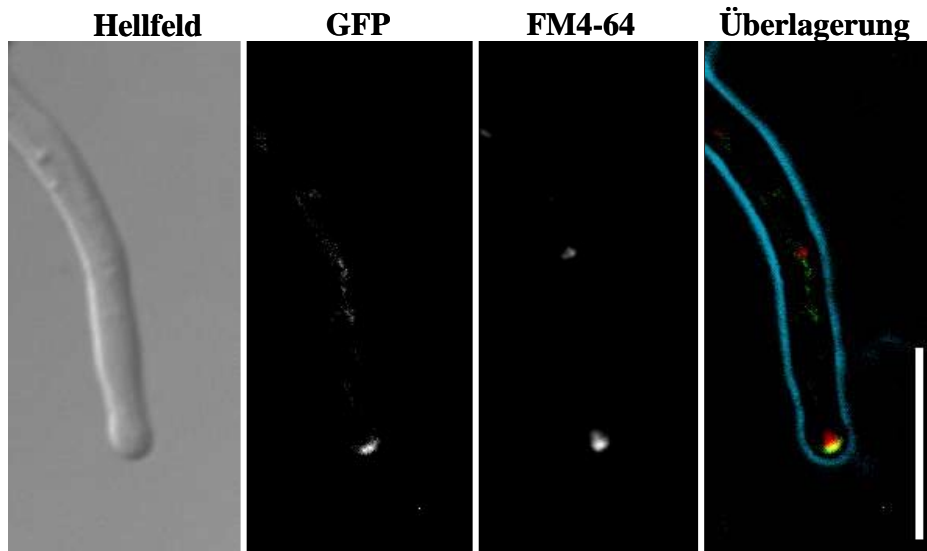


Abbildung 10: Bni1-GFP und der Spitzenkörper kolokalisieren in der Hyphenspitze.

Zellen von *C. albicans* GC59 wurden für 5h bei 37°C in CSM-Medium mit 10% Serum inkubiert und anschließend mikroskopiert. In der Überlagerung ist das GFP-Signal grün, das FM4-64-Signal rot. Die Gelbfärbung zeigt eine Kolokalisierung der beiden Signale an. Größenbalken: 10µm.

4.1.8. Auswirkungen der Deletion von *CaBNI1* auf den Spitzenkörper

Auf Grund der gemeinsamen Lokalisierung von Bni1 und des Spitzenkörpers wurde im Folgenden die Morphologie des Spitzenkörpers im Wildtyp und der *bni1/bni1*-Mutanten untersucht. Dafür wurden drei Stunden alte Hyphen mit FM4-64 angefärbt und mikroskopisch untersucht. In allen untersuchten Wildtyphyphen konnte eine Lokalisierung des Spitzenkörpers in der Hyphenspitze beobachtet werden. Der Spitzenkörper hatte immer ein punktförmiges Aussehen und nahm die gesamte Hyphenspitze ein (Abbildung 11). Wie beim Wildtyp nahm der Spitzenkörper auch in den angeschwollenen Hyphen der *bni1/bni1*-Mutanten die gesamte Hyphenspitze ein. Allerdings sind sowohl Hyphenspitze als auch Spitzenkörper stark verbreitert im Vergleich zur Situation in den Wildtyphyphen, so dass der Spitzenkörper in der

bni1/bni1-Mutante mehr ein kuppel-oder schildförmiges Aussehen hatte (Abbildung 11).

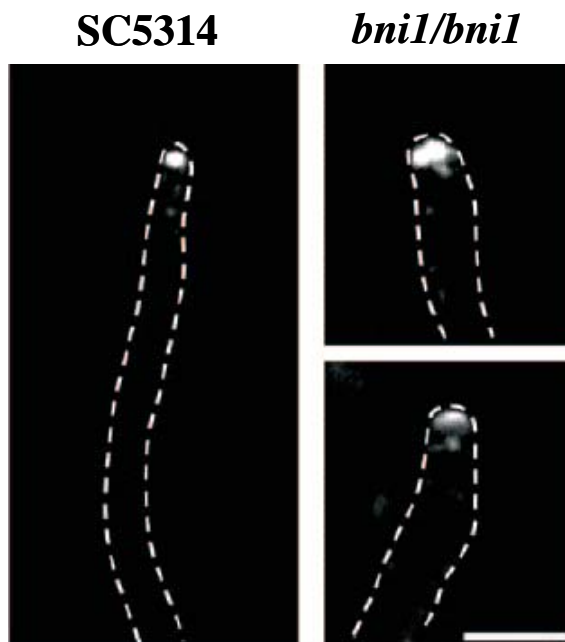


Abbildung 11. Spitzenkörpermorphologie in *C. albicans*.

Zellen der angezeigten Stämme wurden für 3h in Minimalmedium mit 10% Serum inkubiert, mit FM4-64 gefärbt und anschließend mikroskopiert. Größenbalken: 5µm.

4.1.9. Das konstitutiv-aktive *rasI*^{G13V}-Allel kann die Polarisierungsdefekte in der *bni1/bni1*-Mutante nicht kompensieren

Für die weitere Analyse der *bni1/bni1*-Mutante wurden sowohl in BWP17 als auch in einem *bni1/bni1*-Stamm eine *CaMAL2p-rasI*^{G13V}-*CaURA3*-Kassette in den *CaADE2*-Locus integriert. Durch den *CaMAL2*-Promotor war eine Regulation des *rasI*^{G13V}-Allels durch den Wechsel von Glucose zu Maltose als Kohlenstoffquelle möglich. Nach der Konstruktion der Stämme GC42 (BWP17 mit *rasI*^{G13V}) und GC46 (*bni1/bni1*-Mutante mit *rasI*^{G13V}) wurden diese auf den Effekt der Überexpression von *RAS1* untersucht. Zunächst wurden die beiden Stämme in Flüssigminimalmedium mit 10% Serum für 3h bei 37°C angezogen. Für BWP17 und das Derivat mit dem *rasI*^{G13V}-Allel konnte auf Glucose ein filamentöses Wachstum mit langen und schmalen Hyphen beobachtet werden. Der Wechsel der Kohlenstoffquelle zu Maltose hin bewirkte die Aktivierung des *rasI*^{G13V}-Allels. Dabei wurde das Hyphenwachstum jedoch nicht negativ beeinflusst, so dass die Hyphen denen eines BWP17-Stammes ohne das konstitutiv

aktive Allel phänotypisch ähnelten (Abbildung 12). Im *bni1/bni1* Hintergrund zeigte die *ras1^{G13V}*-Mutante auf Glucose-Medium angeschwollenen Hyphen, die charakteristisch für *bni1/bni1*-Mutanten sind. In Maltosemedium, mit angeschaltetem *ras1^{G13V}*-Allel und der damit konstitutiven Aktivität von Ras1 zeigte sich jedoch keine Veränderung des *bni1/bni1*-Phänotyps (Abbildung 12).

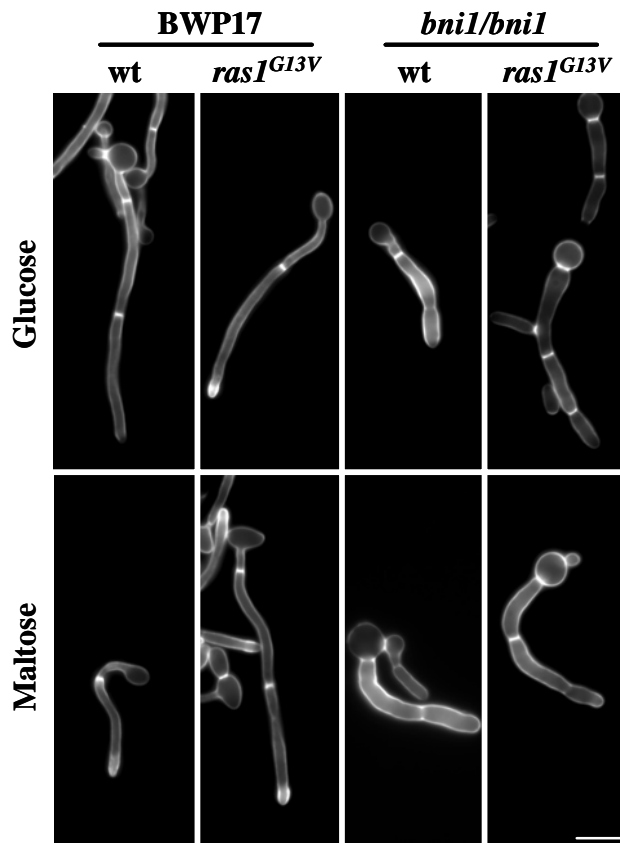


Abbildung 12. Expression des konstitutiv aktiven *ras1^{G13V}*-Allels in *C. albicans*.

Zellen von BWP17 und der *bni1/bni1*-Mutanten wurden für 3h in Minimalmedien mit den angegebenen Kohlenstoffquellen und 10% Serum bei 37°C inkubiert und anschließend mit Calcofluor gefärbt und mikroskopiert. Größenbalken: 10µm.

Für eine Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden von den vier untersuchten Stämmen die Längen und die Breiten von jeweils 100 Hyphen vermessen.

Tabelle 8. Vermessung von Hyphen von Stämmen mit und ohne *ras1^{G13V}*-Allelen

Stamm	Länge in µm (n=100)	Breite in µm (n=100)	Länge-Breite-Index
BWP17	53,7 ± 8,11	2,4 ± 0,36	22,4
BWP17 + <i>ras1^{G13V}</i>	57,0 ± 9,69	2,4 ± 0,41	23,8
<i>bni1/bni1</i>	32,9 ± 3,95	3,5 ± 0,39	9,4
<i>bni1/bni1</i> + <i>ras1^{G13V}</i>	34,9 ± 3,41	3,4 ± 0,31	10,3

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Hyphenvermessung aufgeführt. Dabei zeigte sich, dass die BWP17-Stämme mit über 50µm deutlich längere Hyphen aufwiesen, als die untersuchten *bniI/bniI*-Stämme mit 33-35µm. Sowohl im BWP17- als auch im *bniI/bniI*-Hintergrund hatte die Aktivierung des *rasI*^{G13V}-Allels keine Auswirkungen auf die Hyphenlänge (Tabelle 8). Die *bniI/bniI*-Stämme waren mit etwa 3,5µm Breite deutlich breiter als die BWP17-Stämme mit durchschnittlich 2,4µm. Diese Vermessungsdaten bestätigen die mikroskopischen Beobachtungen, dass die Deletion von *CaBNI1* zu kürzeren und dickeren Hyphen führt (Tabelle 8). Auch bei der Hyphenbreite zeigte die Integration eines konstitutiv aktiven *rasI*^{G13V}-Alleles keine deutlichen Unterschiede. Aus den Vermessungsdaten wurde für die jeweiligen Stämme ein Länge-Breite-Index erstellt. Dabei haben BWP17 und BWP17 mit *rasI*^{G13V} Länge-Breite-Indizes von 22 beziehungsweise 24 (Tabelle 8). Die homozygote *bniI/bniI*-Mutante besitzt einen LBI für Hyphen von 9, was weniger als die Hälfte des Wertes für einen vergleichbaren BWP17-Stamm ist (Tabelle 8). Auch nach der Aktivierung des *rasI*^{G13V}-Allels konnte dieses Verhältnis zwischen Länge und Breite nicht verbessert werden, der LBI für den untersuchten *bniI/bniI* + *rasI*^{G13V} -Stammes betrug mit 10 auch deutlich weniger als der ermittelte Index für das BWP17-Derivat mit konstitutiv aktiven *rasI*-Allel (Tabelle 8).

Im Anschluss wurde versucht, die Ergebnisse dieser Hypheninduktionsversuche mit Flüssigmedium nochmals mit Versuchen auf Festmedium zu überprüfen. Bei der Inkubation von BWP17, der *bniI/bniI*-Mutanten und den jeweiligen Varianten dieser Stämme mit dem konstitutiv aktiven *rasI*^{G13V}-Allel auf Festmedien mit Maltose als Kohlenstoffquelle konnte beobachtet werden, dass durch die unregulierte Aktivität von Ras1^{G13V} auf der betreffende BWP17-Stamm schon bei 30°C Hyphen ausbildete, was bei dem BWP17 mit dem Wildtyp-Ras1 nicht zu beobachten ist (Abbildung 13). Auch bei 37°C ohne Serumzugabe bildete BWP17 keine Hyphen, bei der BWP17-*rasI*^{G13V}-Mutanten konnte jedoch wieder ein Hyphenkranz beobachtet werden (Abbildung 13). Bei 37°C mit 10% Serum bildeten beide Stämme Hyphen aus (Abbildung 13). Weder die *bniI/bniI*-Homozygote noch die *bniI/bniI* + *rasI*^{G13V}-Mutante zeigten unter den getesteten Bedingungen die Ausbildung eines Hyphenkranzes, bei beiden Stämmen waren die Kolonienränder glatt (Abbildung 13). Damit wurden die Beobachtungen aus den Versuchen mit Flüssigmedium bestätigt, dass ein konstitutiv aktives *RAS1*-Allel den Phänotyp der *bniI/bniI*-Mutante nicht supprimieren kann.

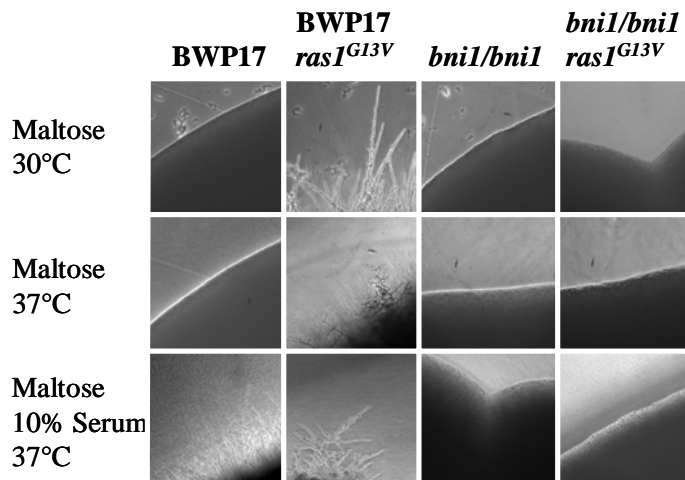


Abbildung 13. Wachstum der *rasI*^{G13V}-Mutanten auf Festmedium.

Zellen der angegebenen Stämme wurden auf Agarplatten mit Minimalmedium und den angegebenen Kohlenstoffquellen und gegebenenfalls 10% Serum aufgetropft und für 3 Tage bei 30°C und 37°C inkubiert und anschließend fotografiert.

4.1.10. Zugabe von cAMP kann den Phänotyp einer *bni1* Deletion nicht aufheben

Nachdem festgestellt wurde, dass eine Expression von konstitutiv aktiven *rasI*^{G13V}-Allelen die Defizite beim Hyphenwachstum einer *bni1/bni1*-Mutante nicht beheben kann, wurde im Folgenden untersucht, ob die Zugabe von cAMP einen positiven Effekt auf das filamentöse Wachstum von Stämmen ohne funktionelles Bni1 hat. Dafür wurden die zu untersuchenden Stämme in Minimalmedium mit 10mM cAMP bei 37°C angezogen und anschließend mikroskopiert. Der Ausgangsstamm BWP17 zeigte nach 3h ein normales filamentöses Wachstum mit langen und schlanken Hyphen. Auch die Expression des *rasI*^{G13V}-Allels in BWP17 führte bei einer Induktion mit cAMP zu einem normalen Hyphenwachstum (Abbildung 14). Die *bni1/bni1*-Mutante zeigte bei unter diesen Bedingungen erneut die angeschwollenen kurzen Hyphen, die auch bei der Induktion mit Serum beobachtet werden konnten. Wurde im Hintergrund der *bni1*-Deletion *rasI*^{G13V} exprimiert zeigte sich auch nach der Zugabe von cAMP keine Verbesserung des Hyphenwachstums (Abbildung 14).

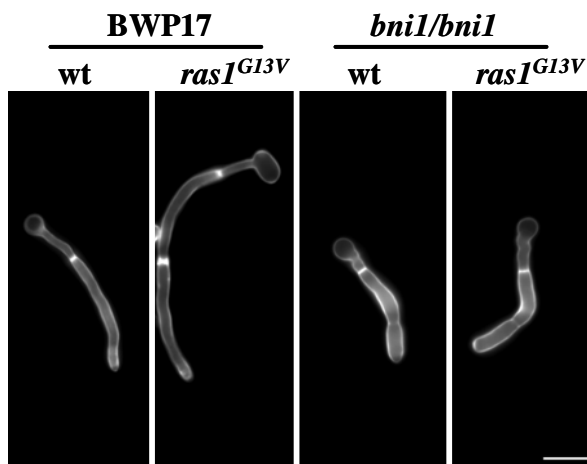


Abbildung 14. Untersuchung des Hyphenwachstums nach Zugabe von cAMP.

Zellen von BWP17, der *bni1/bni1*-Mutante und den jeweiligen Derivaten mit *rasI*^{G13V}-Allelen wurden für 3h in Minimalmedium mit Maltose als Kohlenstoffquelle und 10mM cAMP bei 37°C inkubiert und anschließend mit Calcofluor gefärbt und mikroskopiert. Größenbalken: 10µm.

4.2. Funktionsanalyse von *Candida albicans* Genen, deren *Saccharomyces cerevisiae* Homologe an der Endozytose und der Chitinsynthese beteiligt sind.

4.2.1. Verwendung PCR-basierender Verfahren zur Deletion von Genen und deren Fusion mit GFP oder regulierbaren Promotoren

Für die Herstellung von *C. albicans* Mutanten sind unterschiedliche Methoden bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Deletion von *C. albicans* Genen pFA-Plasmide benutzt, die jeweils ein Markergen (*CaURA3*, *CaARG4*, *CaHIS1*, *CdHIS1*, *CmLEU2*, *SAT1*) trugen. Über eine PCR-Amplifizierung wurden diese Gene mit 100bp großen Homologieregionen versehen, so dass eine gerichtete Integration in ein Allel des Zielgens möglich war (Abbildung 15A). Zur Herstellung einer homozygoten Mutante wurde auch das zweite Allel mit einem anderen Marker ersetzt. Auf diese Art und Weise wurden in den *C. albicans* Stämmen BWP17 und SN148 die Gene *ABP1*, *BZZ1*, *EDE1* und *SMY1* deletiert. Da dieses Verfahren bei der Deletion von *PAN1* nicht erfolgreich war, wurde im Hintergrund einer *PAN1/pan1*-Heterozygoten das verbliebene Wildtypallel unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors gestellt (Abbildung 15C). Die heterozygoten Mutanten wurden auch dafür genutzt, das verbliebene Allel am C-terminalen Ende mit dem Gen für das grünfluoreszierende Protein (GFP) zu fusionieren. Dieses Verfahren wurde angewendet, um sowohl Abp1 als auch Pan1 über GFP-Markierungen *in-vivo* untersuchen zu können (Abbildung 15B).

4.2.2. Untersuchung der Vakuolenmorphologie in verschiedenen *C. albicans* Mutanten

Endozytose ist ein essentieller Prozess für das Überleben von Zellen. Um mehr über die Vorgänge bei der Endozytose in *C. albicans* zu erfahren, wurden verschiedene Gene, deren Homologe in *S. cerevisiae* an Endozytose und myosinvermittelten Prozessen beteiligt sind, untersucht. Zunächst wurde die Aufnahme des Vakuolenfarbstoffes FM4-64 untersucht. Dafür wurden der *C. albicans* Wildtyp SC5314 und die Stämme ohne funktionelles *ABP1*, *BZZ1*, *EDE1* oder *SMY1* mit FM4-64 angefärbt und anschließend auf die Morphologie der Vakuolen in der Mutterzelle untersucht. Alle untersuchten Stämme waren in der Lage, den Farbstoff aufzunehmen, zeigten also keine Defekte bei der Endozytose (Abbildung 16).

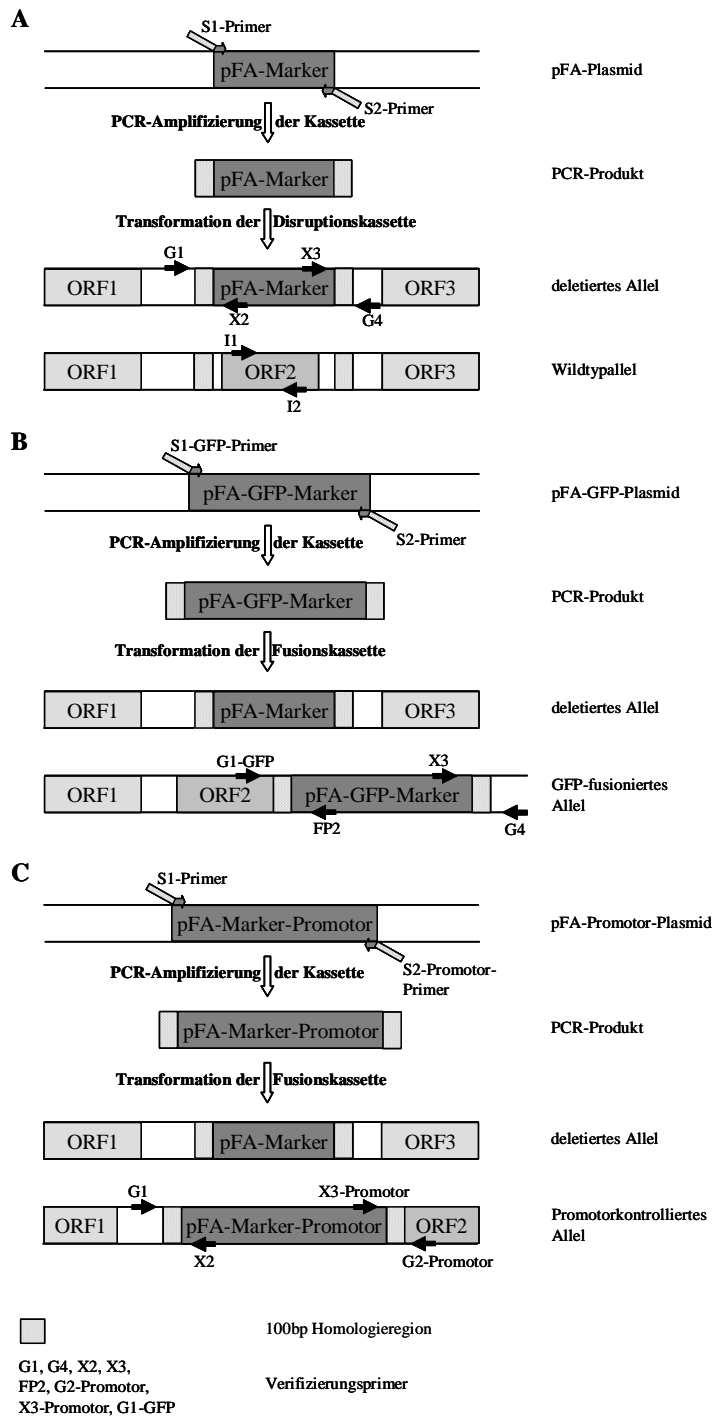


Abbildung 15. Anwendung unterschiedlicher pFA-Plasmide zur funktionellen Analyse von *C. albicans* Genen.

Für die Deletion (A) und die Fusion mit GFP (B) beziehungsweise einem regulierbaren Promotor (C) sind verschiedene pFA-Module verfügbar. Die Amplifizierung der Markergene mit S-Primern, welche die 100bp Homologieregion enthalten, ermöglicht die Herstellung der Transformationskassetten. Die korrekte Integration der Markerkassetten und die komplette Deletion der Zielgene wird mit Verifizierungsprimern überprüft.

Bei den Untersuchungen der Vakuolenmorphologie zeigte SC5314 bei 68% der Mutterzellen nur eine einzige große Vakuole (Abbildung 16, Tabelle 9). 27% der untersuchten Wildtypzellen besaß zwei bis drei meist gleich große Vakuolen, eine höhere Anzahl von Vakuolen in der Mutterzelle war mit 6% selten (Tabelle 9).

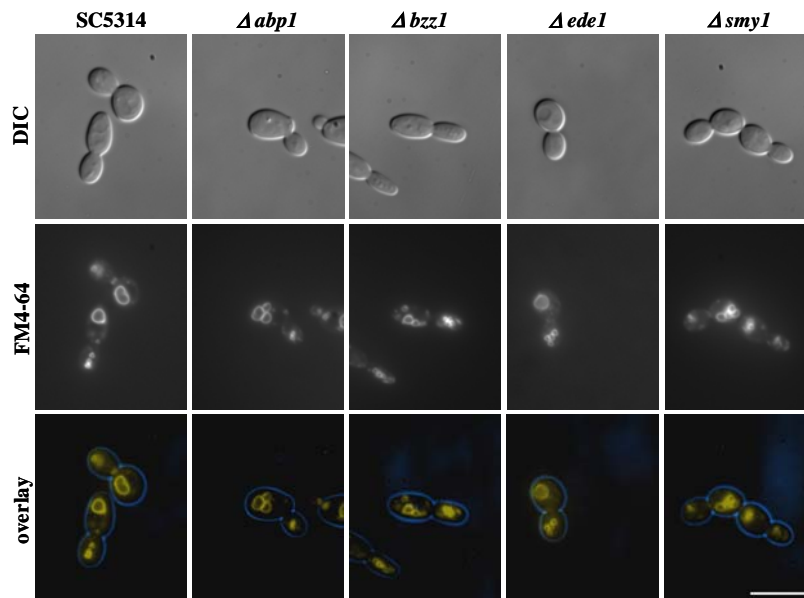


Abbildung 16. Vakuolenmorphologie in verschiedenen *C. albicans* Mutanten.

Die angezeigten Stämme wurden über Nacht in YPD bei 30°C angezogen. Anschließend wurden Zellen der Stämme in frisches YPD mit 1µl FM4-64/ml Medium überimpft und nachfolgend für 3h bei 30°C inkubiert und anschließend mikroskopiert. Größenbalken: 10µm.

Tabelle 9. Quantifizierung der Vakuolenmorphologie in verschiedenen *C. albicans* Stämmen

Vakuolen pro Zelle	SC5314 (n=200)	<i>abp1/abp1</i> (n=200)	<i>bzz1/bzz1</i> (n=200)	<i>ede1/ede1</i> (n=200)	<i>smy1/smy1</i> (n=200)
1	68%	42%	37%	56%	36%
2 bis 3	27%	42%	47%	36%	36%
4 und mehr	5%	16%	16%	8%	28%

Die *Δabp1*-Mutante von *C. albicans* zeigte eine Steigerung bei der Anzahl von Zellen mit zwei oder drei Vakuolen, so dass ihr Anteil mit 42% genauso groß war, wie der der Zellen mit nur einer Vakuole (Abbildung 16, Tabelle 9). Auch die Zahl der Zellen mit mindestens vier Vakuolen erhöhte sich im Vergleich zum Wildtyp auf 16% (Tabelle 9). Bei der Mutante ohne funktionelles *BZZ1*-Gen konnte beobachtet werden, dass fast die Hälfte der Zellen zwischen zwei und drei Vakuolen besaß, während der Anteil der Zellen mit nur einer Vakuole lediglich bei 37% lag. Im Vergleich zu Wildtypzellen erhöhte sich der Anteil von Zellen mit mindestens vier Vakuolen auf 16%, was auch bei

der *Δabp1*-Mutante zu beobachten war (Abbildung 16, Tabelle 9). Die Deletion des *CaEDE1*-Gens hatte im Gegensatz dazu kaum Auswirkungen auf die Morphologie der Vakuolen. Knapp 56% der Zellen zeigten nur eine Vakuole, bei 36% konnten nur zwei oder drei Vakuolen beobachtet werden. Mit 8% lag die Anzahl von Zellen mit mindestens vier Vakuolen leicht über dem Niveau von SC5314 (Abbildung 16, Tabelle 9). Die *Δsmy1*-Mutante zeigte von allen untersuchten Stämmen den geringsten Anteil von Zellen mit nur einer Vakuole (36%, Tabelle 9). Auch die Zellen mit zwei oder drei Vakuolen waren geringer als beispielsweise bei der *Δbzz1* oder *Δabp1*-Mutante (36%, Tabelle 9). Mit 28% war der Anteil der Zellen mit mindestens vier Vakuolen ungewöhnlich hoch. Diese Vakuolen waren auch kleiner als die der anderen Stämme (Abbildung 16, Tabelle 9).

4.2.3. Die untersuchten *C. albicans* Mutanten zeigen keine Defekte während des polaren Hyphenwachstums

Die erzeugten Mutanten *Δabp1*, *Δbzz1*, *Δedel* und *Δsmy1* wurden nicht nur auf ihre veränderte Vakuolenmorphologie und Endozytose hin überprüft, sondern auch auf ihre Fähigkeit zum filamentösen Wachstum. Dafür wurden die Mutanten und der Wildtypstamm SC5314 in verschiedenen Medien bei 37°C inkubiert. Zunächst wurden diese Versuche in Flüssigmedien durchgeführt. Dafür wurden neben der Induktion mit Serum und N-Acetylglucosamin auch Lee's- und Spider-Medium verwendet. Der Wildtyp SC5314 zeigte unter allen getesteten Bedingungen die Ausbildung von Hyphen (Abbildung 17). Auch die untersuchten Mutanten zeigten ein wildtyp-ähnliches filamentöses Wachstum unabhängig vom verwendeten Medium (Abbildung 17A).

Trotz der veränderten Vakuolenmorphologie konnten in Flüssigmedien keine Defekte im Hyphenwachstum der Mutanten beobachtet werden. Um eventuelle Auswirkungen der Deletionen auf das langfristige filamentöse Wachstum zu untersuchen, wurden die Mutanten und der Wildtyp nochmals auf Festmedien untersucht. Nach einer Inkubation von vier Tagen bei 37°C konnte jedoch bei keiner Mutante auf einem der untersuchten Medien ein Defekt bei der Ausbildung von Hyphen festgestellt werden (Abbildung 17B).

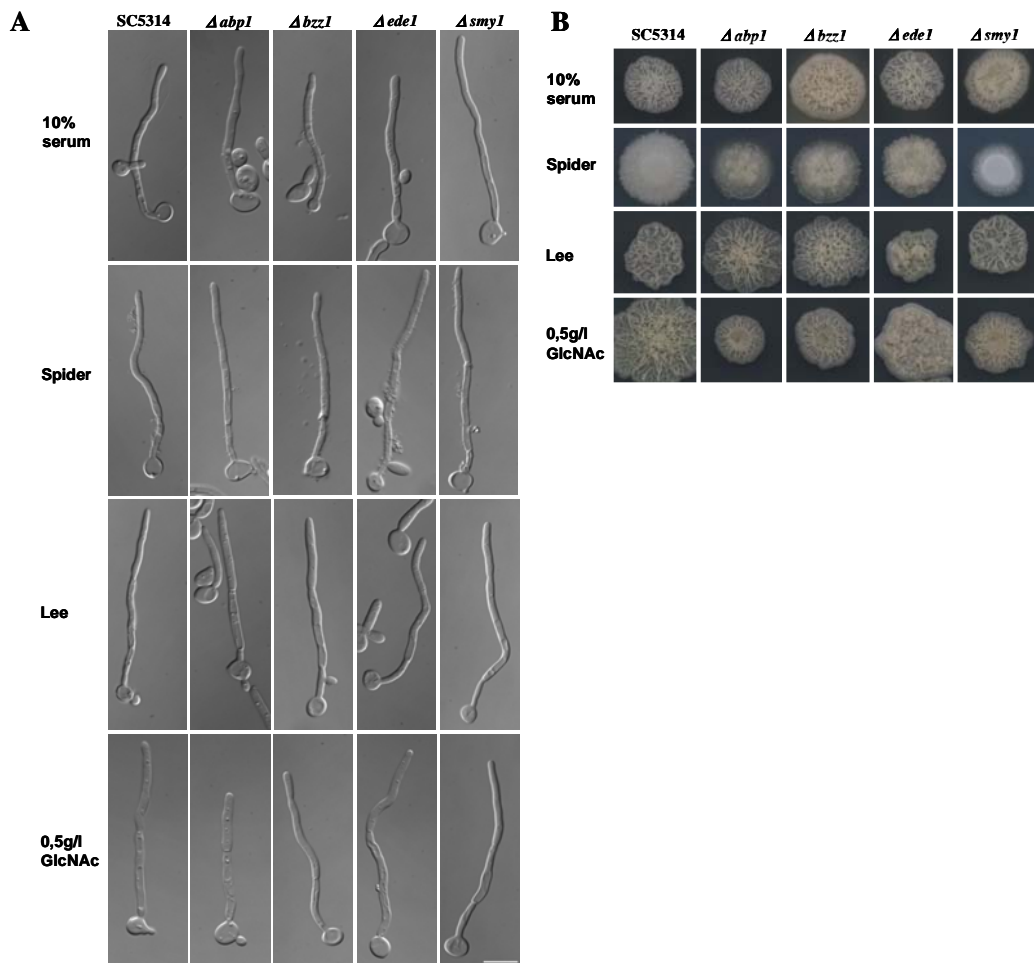


Abbildung 17. Filamentöses Wachstum verschiedener *C. albicans* Stämme.

(A) Die angezeigten Stämme wurden über Nacht in Minimalmedium bei 30°C angezogen und anschließend in den aufgeführten Medien verdünnt und bei 37°C für 4h inkubiert. Für die Hypheninduktion mit Serum oder N-Acetylglucosamin (GlcNAc) wurde Minimalmedium verwendet.

(B) Die angezeigten Stämme wurden über Nacht in Minimalmedium bei 30°C angezogen und anschließend auf Agarplatten mit den aufgeführten Medien getropft und bei 37°C für 4 Tage inkubiert. Für die Hypheninduktion mit Serum oder N-Acetylglucosamin wurde Minimalmedium verwendet.

Größenbalken: 10µm.

4.2.4. Funktionelle Analyse von *CaPAN1*

Für die funktionelle Analyse des *CaPAN1*-Gens wurde ein Allel unter die Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors gestellt, nachdem das erste Allel deletiert worden war (siehe Abbildung 15C). Daraus resultierte der Stamm GC132 (*CmLEU2-MET3p-PAN1/pan1::CaURA3*), welcher im Folgenden genauer untersucht wurde. Zum Abschalten des *MET3*-Promotors wurden die Zellen für vier Stunden in Minimalmedium mit 2,5mM Methionin und 2,5mM Cystein bei 30°C inkubiert und

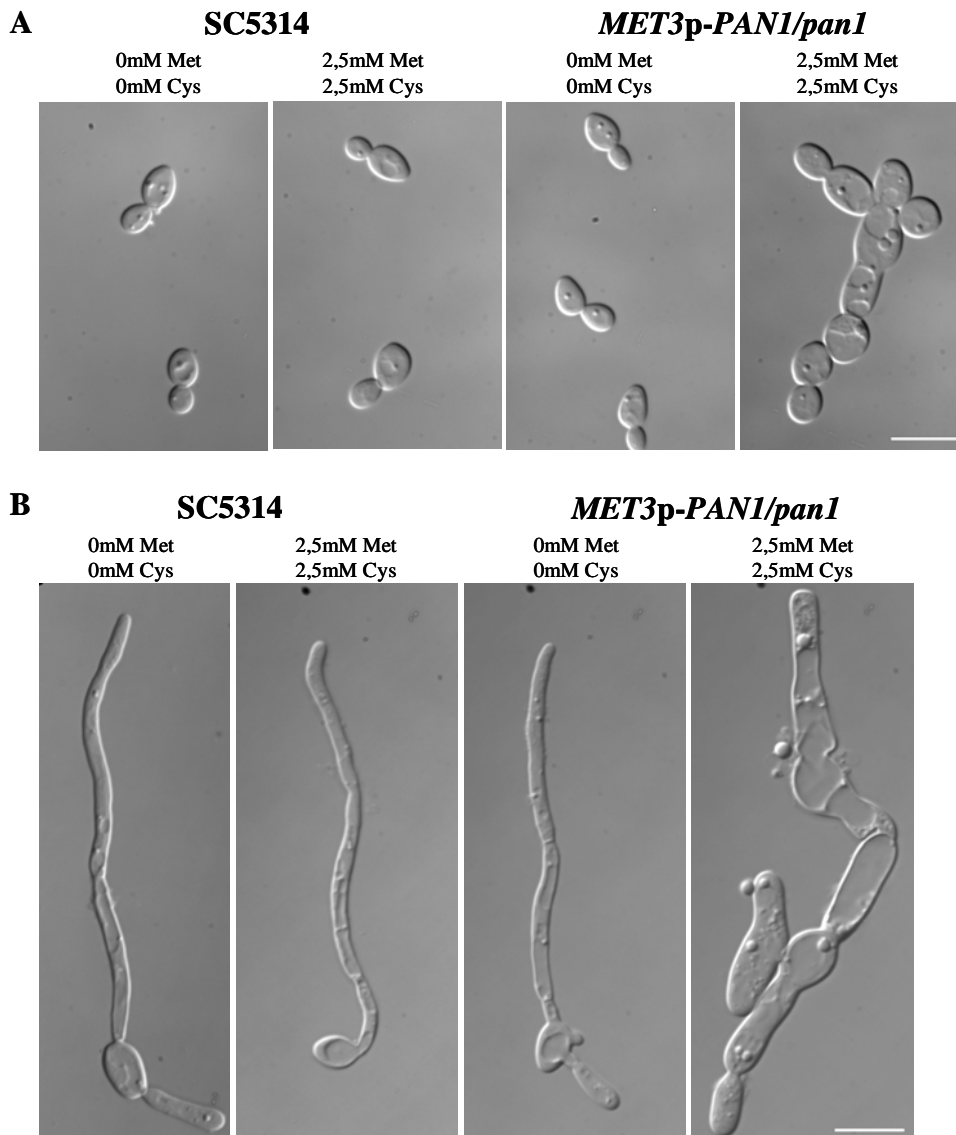


Abbildung 18. Abschaltung des *PAN1*-Gens führt zu morphologischen Defekten.

Der *C. albicans* Wildtyp SC5314 und GC132 (*MET3p-PAN1/pan1*) wurden über Nacht in SD-Minimalmedium bei 30°C angezogen und anschließend in frischem SD verdünnt. Dabei wurden parallel Ansätze mit je 2,5mM Methionin und 2,5mM Cystein beziehungsweise ohne diese Aminosäuren für 4h bei 30°C inkubiert und danach mikroskopiert (A). (B) Nach der Vorinkubation bei 30°C wurden zu den Ansätzen Serum zugegeben (Endkonzentration 10%) und diese für 3h bei 37°C angezogen. Größenbalken: 10µm.

anschließend untersucht, beziehungsweise nochmals für drei Stunden bei 37°C zur Induktion des filamentösen Wachstums angezogen. Während des Hefewachstum zeigte der *MET3p-PAN1/pan1*-Stamm in Medium ohne Methionin und Cystein die Ausbildung von Zellen, die morphologisch denen des Wildtyps ähnelten. Damit konnte gezeigt werden, dass der *MET3*-Promotor unter diesen Bedingungen aktiv ist (Abbildung 18A). Die Zugabe der beiden Aminosäuren führte bei SC5314 zu keinen Veränderungen, während bei GC132 die Abschaltung des *MET3*-Promotors und der damit verbundene Verlust eines aktiven *PAN1*-Gens massive morphologische Defekte verursachte. Die

Zellen waren angeschwollen und konnten sich nicht voneinander trennen (Abbildung 18A). Auch während des filamentösen Wachstum hatte die Zugabe von Methionin und Cystein bei GC132 zur Folge, dass der Stamm keine wildtypähnliche Hyphen ausbildete, sondern ebenfalls nur extrem angeschwollene Zellklumpen, die sich deutlich von den Hyphen des Wildtyps oder von GC132 in Medium ohne Methionin und Cystein unterschieden (Abbildung 18B).

Die Rolle von Pan1 in *C. albicans* während der Endozytose wurde mit einem FM4-64-Aufnahmeversuch untersucht. SC5314 zeigte nach einer Stunde Inkubation nicht nur die Aufnahme von FM4-64 sondern auch die Anfärbung der Vakuolen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen Zellen, die ohne Methionin/ Cystein angezogen wurden und denen, bei denen diese Aminosäuren im Medium enthalten waren (Abbildung 19).

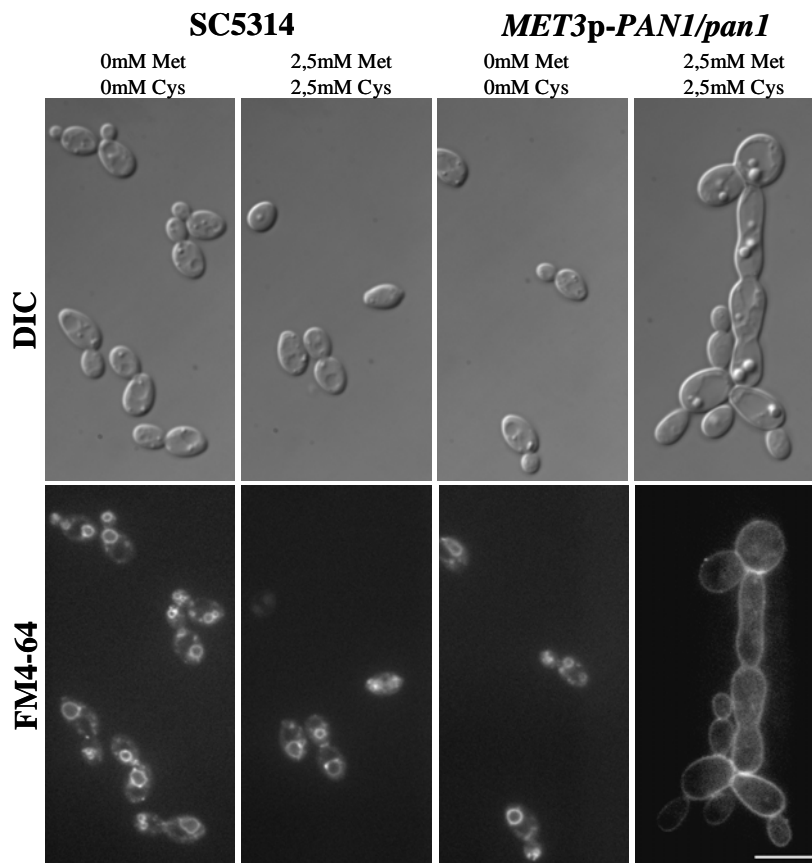


Abbildung 19. Abschalten von PAN1 führt zu Defekten in der Endozytose.

Der *C. albicans* Wildtyp SC5314 und GC132 (*MET3p-PAN1/pan1*) wurden über Nacht in SD-Minimalmedium bei 30°C angezogen und anschließend in frischem Minimalmedium mit oder ohne Methionin und Cystein verdünnt. Die Ansätze wurden für 4h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde auf 1ml Zellsuspension 2µl FM4-64 gegeben und die Ansätze für eine Stunde bei 30°C schüttelnd inkubiert, bevor die Ansätze mikroskopiert wurden. Größenbalken: 10µm.

Der Stamm GC132, in welchem *PAN1* unter Kontrolle des *MET3*-Promotors steht, zeigte in Medien ohne Methionin und Cystein ebenfalls die Aufnahme von FM4-64 und die Anfärbung der Vakuolen (Abbildung 19). Wurde der *MET3*-Promotor jedoch durch die Zugabe der beiden Aminosäuren ausgeschaltet und damit auch die Expression von *PAN1* gestoppt, so waren die Zellen nicht mehr in der Lage den Farbstoff aufzunehmen. Stattdessen lagerte er sich an den Zellmembranen ab. Damit konnte gezeigt werden, dass in *C. albicans* Pan1 essentiell für die Endozytose ist (Abbildung 19).

4.2.5. Lokalisierung von Abp1-GFP und Pan1-GFP

Im Folgenden wurde die Lokalisierung der beiden Arp2/3-Aktivatoren Abp1 und Pan1 in *C. albicans* untersucht. Dafür wurden in heterozygoten *ABP1/abp1*- und *PAN1/pan1*-Mutanten die jeweiligen verbliebenen Wildtypallele am 3'-Ende mit dem Gen für das grünfluoreszierende Protein (GFP) fusioniert (siehe auch Abbildung 15B). In den so erzeugten Stämmen wurde anschließend die Verteilung der GFP-markierten Proteine untersucht. Dabei zeigte sich für beide Aktivatoren ein ähnliches Verteilungsmuster. Während des Hefewachstums waren sowohl Abp1-GFP als auch Pan1-GFP am stärksten in den Knospenspitzen lokalisiert, während in den Mutterzellen nur wenige GFP-Signale zu beobachten waren (Abbildung 20).

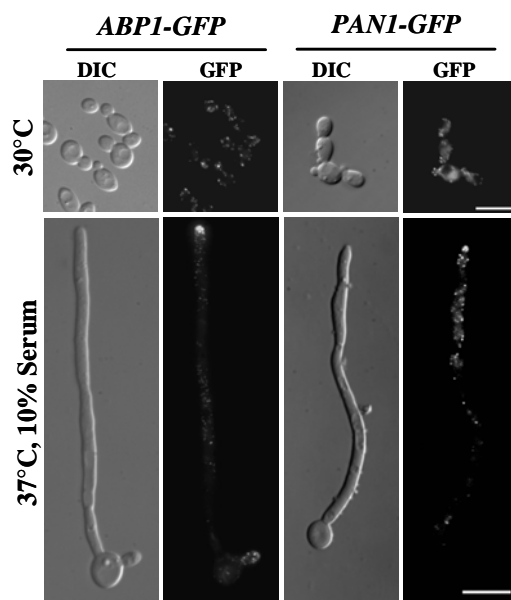


Abbildung 20. Lokalisierung von Abp1-GFP und Pan1-GFP in *C. albicans*.

Die angezeigten Stämme wurden über Nacht in Minimalmedium bei 30°C angezogen und anschließend mit frischem CSM-Medium mit oder ohne 10% Serum verdünnt und im Folgenden für 3h bei 30°C beziehungsweise 37°C inkubiert. Größenbalken: 10µm.

Während des Hyphenwachstums konnte festgestellt werden, dass sowohl Abp1-GFP als auch Pan1-GFP sehr stark in der Hyphenspitze konzentriert sind (Abbildung 19). Für beide Proteine konnte auch im Rest der Hyphen eine weniger starke Lokalisierung festgestellt werden, wobei die Pan1-GFP-Signale eine größere Intensität als die vergleichbaren Abp1-Signale aufwiesen (Abbildung 20).

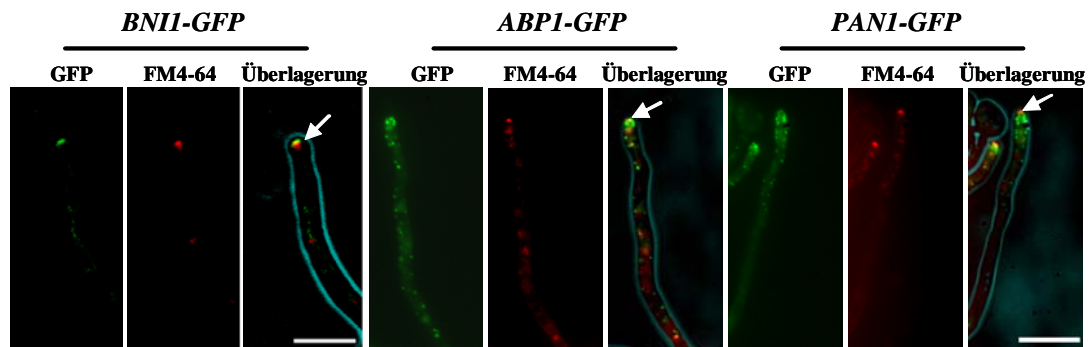


Abbildung 21. Abp1-GFP und Pan1-GFP lokalisieren nicht vollständig mit dem Spitzenkörper.

Zellen der angegebenen Stämme wurden in Minimalmedium mit 10% Serum für 4h bei 37°C inkubiert und anschließend mit FM4-64 gefärbt und mikroskopiert. Aus den GFP-Bildern (grün) und den Fm4-64-gefärbten Spitzenkörperbildern (rot) wurde mit der Metamorph-Software ein Überlagerungsbild erstellt. Dabei zeigt sich die Kolokalisierung von Bni1-GFP mit dem Spitzenkörper (Gelbfärbung bei Überlagerung), während Abp1-GFP und Pan1-GFP weitestgehend unabhängig vom Spitzenkörper lokalisiert sind. Größenbalken: 10µm.

Auf Grund der Lokalisierung von Abp1 und Pan1 in der Hyphenspitze war es von Interesse, inwieweit diese beiden Proteine mit dem Spitzenkörper kolokalisieren. Als Vergleich diente die Lokalisierung von Bni1-GFP, welches im Gegensatz zu Abp1-GFP und Pan1-GFP punktförmig in der Hyphenspitze lokalisiert und sich auch genau mit dem Spitzenkörper überlagert (Abbildung 21). Weder Abp1-GFP noch Pan1-GFP zeigen in der Hyphenspitze diese Kolokalisierung mit dem Spitzenkörper. Der Großteil dieser beiden Proteine ist unabhängig von dieser Struktur lokalisiert, nur wenige Partikel überlagern sich damit (Abbildung 21).

4.2.6. *C. albicans* Mutanten ohne funktionelles *GNAI*-Gen benötigen zum Wachstum N-Acetylglucosamin

Um die Deletion von *C. albicans* Genen mit Hilfe von PCR-amplifizierten Disruptionskassetten weiter fortzuführen, wurde das Gen *CaGNAI* ausgewählt.

C. albicans Stämme ohne funktionelles *GNAI*-Gen waren nicht in der Lage auf Medien ohne N-Acetylglucosamin zu wachsen (Abbildung 22A). Auch in YPD-Medium, welches durch den zugefügten Hefeextrakt Spuren von N-Acetylglucosamin enthält,

war die *ΔgnaI*-Mutante nicht fähig, Kolonien auszubilden. Nur in Medien, die ausreichende Mengen dieses Zuckers wie 0,5g/l oder 10g/l enthielten, konnte die Mutante wachsen. Auch in Medien, die nur N-Acetylglucosamin als Kohlenstoffquelle enthielten war Wachstum möglich (Abbildung 22A). Da *C. albicans* in Abwesenheit von N-Acetylglucosamin auf ein funktionelles *GNAI*-Gen angewiesen ist, war es von Interesse herauszufinden, inwieweit das Hyphenwachstum durch die Deletion des Gens betroffen war. In reinem Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle zeigte der Wildtyp SC5314 ein hefeförmiges Wachstum, während die *ΔgnaI*-Mutante Pseudohyphen ausbildete und ein sehr schlechtes Wachstum zeigte (Abbildung 22B). Enthielt das Medium zusätzlich 0,5g/l N-Acetylglucosamin zeigten sowohl der Wildtyp als auch die Mutante ein ähnliches Hyphenwachstum (Abbildung 22B). Wurde statt des Zuckers die Aminosäure Prolin dem Medium zugefügt, dann war der Wildtyp wiederum in der Lage Hyphen auszubilden, während die Mutante lediglich zu Pseudohyphenwachstum in der Lage war (Abbildung 22B). Das Verhalten der *ΔgnaI*-Mutante wurde im weiteren Verlauf der Arbeiten mit dem Schweinedarmepithel- Assay (PIE) untersucht. Dabei sollte vorallem festgestellt werden, ob die Mutante in der Lage war, auf dem Blinddarmepithelium eines frisch geschlachteten Schweins zu wachsen und inwiefern es die Epithelien penetrieren konnte. Der Wildtyp SC5314 konnte auf den Schweinedarmepithelien Hyphen ausbilden, die das Gewebe penetrierten und nicht abwaschbar waren (Abbildung 22C). Die *GNAI/gnaI*-Heterozygote bildete auf den Epithelien im Hyphen und einen großen Anteil an Pseudohyphen aus, die deutlich kürzer waren als die von SC5314. Nach dem Abwaschen der Darmstücke blieben neben den Hyphen aber auch die meisten Pseudohyphen haften, was zeigte, dass auch diese fähig waren, an die Darmepithelzellen zu ahärieren (Abbildung 22C). Die *ΔgnaI*-Homozygote zeigte auf den Schweinedarmepithelien kein wildtypähnliches Hyphenwachstum sondern nur die Ausbildung von Pseudohyphen. Diese waren auch nicht in der Lage, an die Epithelzellen zu adhäreren, sondern konnten vollständig abgewaschen werden (Abbildung 22C).

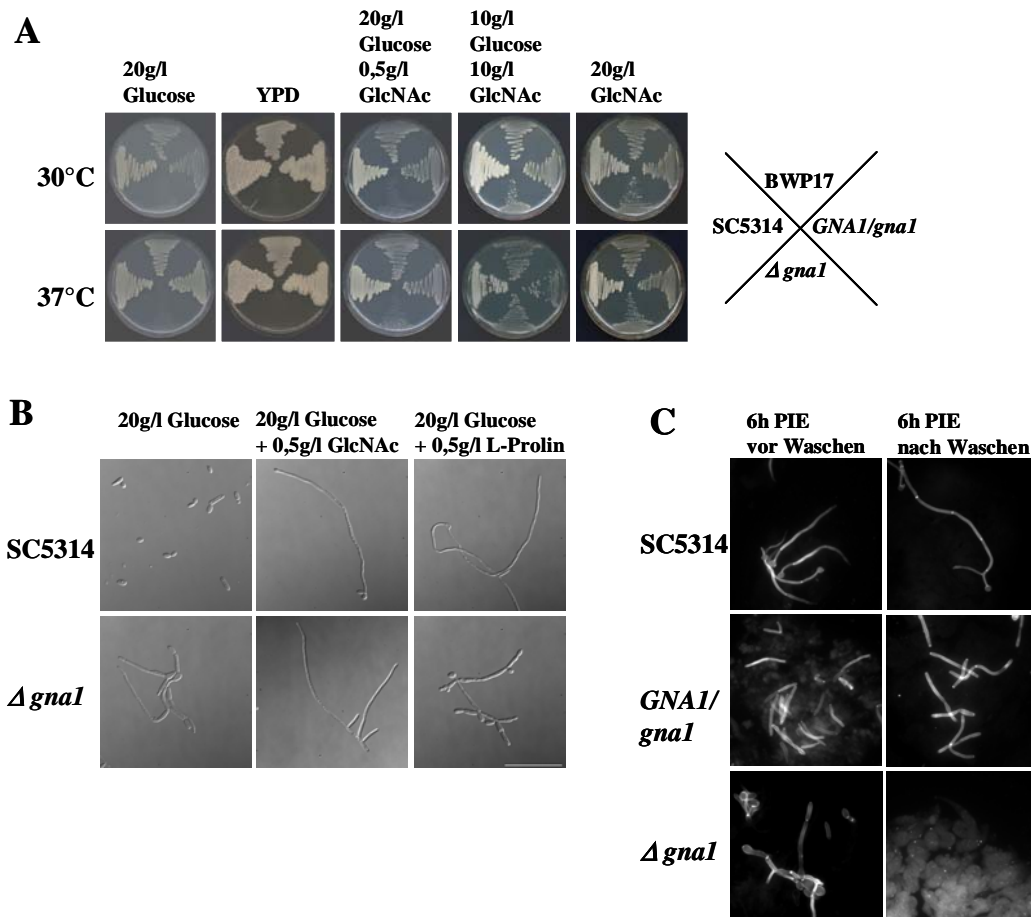


Abbildung 22. Wachstum der *gna1/gna1*-Mutanten von *C. albicans* benötigt die Zugabe von N-Acetylglucosamin.

(A) Zellen der angezeigten Stämme wurden über Nacht in Minimalmedien mit je 10g/l Glucose und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) bei 30°C angezogen. Anschließend wurden je 5μl dieser Vorkulturen auf Platten mit unterschiedlichen Mengen von Glucose und N-Acetylglucosamin als C-Quellen aufgetropft und für 3 Tage bei 30°C beziehungsweise 37°C inkubiert und danach fotografiert. (B) Hyphenwachstum der *Δgna1*-Mutante. Wildtypstamm SC5314 und die *gna1/gna1*-Homozygote wurden bei 37°C in Minimalmedium mit oder ohne 0,5g/l N-Acetylglucosamin oder 0,5g/l L-Prolin für 4h angezogen und anschließend mikroskopiert. Die *gna1*-Mutante zeigte nur in Anwesenheit von N-Acetylglucosamin Hyphenwachstum. Größenbalken: 10μm (C) Analyse des Wachstums der *gna1/gna1*-Homozygoten mit dem Porcine Intestinal Epithelium Assay (PIE). Die Zellen der angezeigten Stämme wurden für 6h auf den Epithelien bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Gegensatz zum Wildtyp und zur Heterozygoten konnten die Pseudohyphen der *Δgna1*-Mutanten von den Epithelien abgewaschen werden. Größenbalken: 50μm

4.3. Expression der CTA2-Gene in *Candida albicans*

4.3.1. Vergleich der Protein- und DNA-Sequenzen der CTA2-Familie

Das Genom von *C. albicans* enthält 14 offene Leserahmen, welche für Proteine der Cta2-Familie kodieren. Diese Proteine wurden in einem Hefe-1-Hybrid-Versuch als Transkriptionsaktivatoren identifiziert (CTA= Candida Transkriptionsaktivator, Kaiser et al., 1999). Alle diese Proteine zeichnen sich durch eine charakteristische Startsequenz aus, welche aus Methionin, Prolin, Glutamat und Asparagin (MPEN) besteht. Von den Cta2-Proteinen mit dem MPEN-Start wurde mit der DNASTAR-Software ein phylogenetischer Stammbaum hergestellt. Dabei ist die Unterteilung der Cta2-Proteine in zwei Unterfamilien deutlich zu erkennen (Abbildung 23). Die Unterfamilie A enthält acht der Cta2-Proteine, während die restlichen sechs die Unterfamilie B bilden.

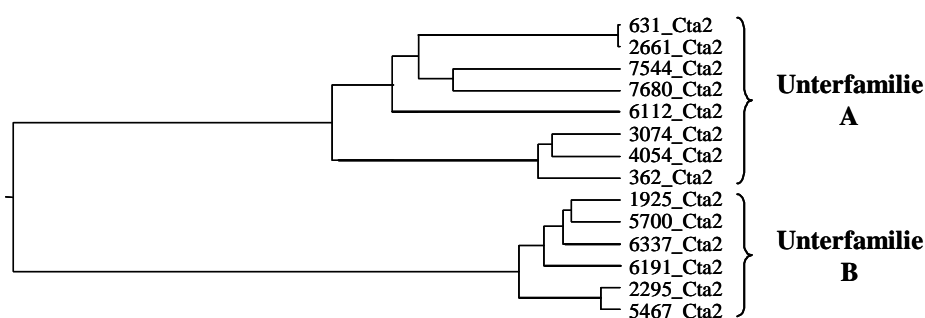


Abbildung 23. Phylogenetischer Stammbaum der Cta2-Proteine von *C. albicans*.

Der Stammbaum wurde mit der DNASTAR-Software erstellt und beinhaltet alle Proteine der CTA2-Familie. Die Ziffern vor den Proteinennamen bezeichnen den ORF (z.B. ORF 19.6191 = 6191_Cta2).

Die Cta2-Proteine der Unterfamilie A sind zwischen 225 und 273 Aminosäuren groß und weisen untereinander Aminosäureidentitäten von 63,3 bis 98,8% auf (Tabelle 10).

Tabelle 10. Aminosäureidentitäten der Cta2-Proteine der A-Unterfamilie (in Prozent).

	362_ Cta2	631_ Cta2	2661_ Cta2	3074_ Cta2	4054_ Cta2	6112_ Cta2	7544_ Cta2	7680_ Cta2
362_Cta2	xxx	91,6	91,6	94,5	91,2	92,5	90,3	63,3
631_Cta2	91,6	xxx	98,8	93,6	88,5	94,1	95,6	79,8
2661_Cta2	91,6	98,8	xxx	93,6	89,3	93,0	94,0	78,9
3074_Cta2	94,5	93,6	93,6	xxx	94,1	93,2	92,7	82,7
4054_Cta2	91,2	88,5	89,3	94,1	xxx	89,3	88,0	77,9
6112_Cta2	92,5	94,1	93,0	93,2	89,3	xxx	96,4	79,7
7544_Cta2	90,3	95,6	94,0	92,7	88,0	96,4	xxx	84,5
7680_Cta2	63,3	79,8	78,9	82,7	77,9	79,7	84,5	xxx

Dabei weicht das vom ORF 19.7680 kodierte Cta2 von den anderen Proteinen ab, zu denen es nur Identitäten von weniger als 90% aufweist, während die restlichen Proteine der Unterfamilie untereinander in der Regel zu über 90% identisch sind (Tabelle 10).

Die Proteine der Unterfamilie B sind kürzer und umfassen zwischen 169 und 176 Aminosäuren. Untereinander zeigen diese B-Cta2-Proteine jedoch eine hohe Aminosäureidentität, die bei mindestens 94% liegt (Tabelle 11).

Tabelle 11. Aminosäureidentitäten der Cta2-Proteine der B-Unterfamilie (in Prozent).

	1925_Cta2	2295_Cta2	5467_Cta2	5700_Cta2	6191_Cta2	6337_Cta2
1925_Cta2	xxxxxxx	94,3	95,3	95,3	95,9	98,3
2295_Cta2	94,3	xxxxxxx	97,0	95,9	95,9	94,8
5467_Cta2	95,3	97,0	xxxxxxx	95,9	96,4	95,9
5700_Cta2	95,3	95,9	95,9	xxxxxxx	97,0	95,9
6191_Cta2	95,9	95,9	96,4	97,0	xxxxxxx	96,4
6337_Cta2	98,3	94,8	95,9	95,9	96,4	xxxxxxx

Die beiden Unterfamilien unterscheiden sich sowohl in der Größe als auch in der Schlußsequenz der jeweiligen Proteine. Während alle Mitglieder der Unterfamilie A am Ende die Aminosäuren Glutamin, Phenylalanin, Glycin und Asparagin (QFGN) aufweisen, ist bei den B-Proteinen eine andere Schlußsequenz mit Phenylalanin, Leucin, Arginin und nochmals Leucin (FLRL) zu erkennen. Interessanterweise zeigen alle Cta2-Proteine interne Wiederholungssequenzen, die aus zwei Glutamatresten, Alanin, Arginin und abschließend zwei Lysinresten bestehen. Die Anzahl dieser EK-Motive (EK für glutamat- und lysinreich) ist bei den einzelnen Proteinen unterschiedlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von jeder Unterfamilie ein Vertreter genauer untersucht. Dabei wurde für den A-Zweig der 771bp große ORF 19.2661 ausgewählt, welcher für ein 256 Aminosäure großes Protein kodiert. Als Vertreter der B-Familie wurde der ORF 19.6191 untersucht, der 510bp umfasst und für ein Protein von 169 Aminosäuren kodiert. In der Aminosäuresequenz ist sehr gut zu sehen, dass die ersten 100 Aminosäuren am N-terminalen Ende der Proteine hochkonserviert sind, während sich die C-terminalen Bereiche stärker unterscheiden (Abbildung 24). Die Unterschiede zwischen den beiden Proteinen liegen an der verschiedenen Anzahl der EK-Wiederholungssequenzen. Während 6191_Cta2 lediglich vier solcher Motive aufweist, sind es bei 2661_Cta2 elf. Damit ist vor allem der Größenunterschied zu erklären. Die letzten Aminosäuren sind stark verschieden. 2661_Cta2 weist den für A-Familien-Cta2-Proteine typischen QFGN-Schluss auf, während bei 6191_Cta2 die Aminosäuren den

Phenylalanin, Lysin und Arginin den für die B-Familie typischen FLRL-Schluss bilden (Abbildung 24).

A

```

1  MPENLQTRLHNSLDEILKSSGYIFEVIDQNRKQSNVITSPNNELIQKSITQLNGEIQNFHAILDQTVSKLNDAE 2661_Cta2
1  MPENLQTRLHNSLDEILKSSGYIFEVIDQNRKQSNVITSPNNELIQKSITQLNGEIQNFHAILDQTVSKLNDAE 6191_Cta2

76  WCLGVMVEKKKKHDELKVKKEAARKKEEBAKKKEEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKK 2661_Cta2
76  WCLGVMVEKKKKHDELKVKKEAARKKEEBAKKKEEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKK 6191_Cta2

151  EEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKKAEAKK 2661_Cta2
116  -----FILLFCQIQITIFNSCANILFYLIETIFYETI-----ILFYRIF 6191_Cta2

226  ILDGLNMILLDNGDHVNEEFVDVDSFLNQFGN 2661_Cta2
153  YIFSLSTELI-----YNI--FLRL 6191_Cta2

```

B

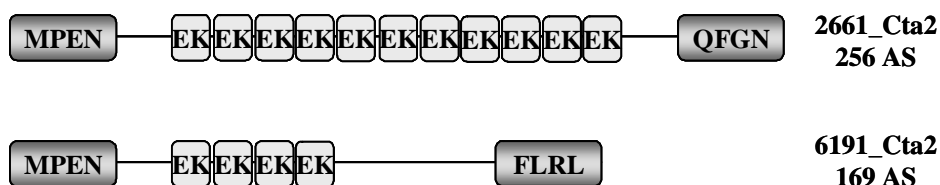


Abbildung 24. Vergleich der Proteinsequenzen der beiden Proteine 2661_Cta2 und 6191_Cta2.

(A) Basierend auf den DNA-Sequenzen der beiden Gene wurde mit Hilfe der DNASTAR-Software die Aminosäuresequenz der Proteine erstellt. Die schwarz Kästchen zeigen eine identische Aminosäure in beiden Proteinen. Auffällig ist die hohe Konservierung im N-terminalen Bereich. Die grau eingefärbten Kästchen stellen die EK-Motive dar. (B) Schematische Darstellung der beiden Proteine. MPEN zeigt die gemeinsame Startsequenz, EK steht für die Glutamat-Lysin-reichen Motive. Die am 3'-Ende der der Proteine sind entweder QFGN- oder FLRL-Motive zu finden.

Tabelle 12. Vergleich der einzelnen CTA2-Gene in ORF-Größe, Proteingröße und Anzahl der EK-Motive.

CTA2-ORF	ORF-Größe	Proteingröße	Anzahl der EK-Motive im Protein
19.362 ^a	678bp	225AS	8
19.631 ^a	774bp	257AS	12
19.2661 ^a	771bp	256AS	11
19.3074 ^a	660bp	219AS	7
19.4054 ^a	759bp	252AS	12
19.6112 ^a	768bp	255AS	12
19.7544 ^a	753bp	250AS	11
19.7680 ^a	822bp	273AS	10
19.1925 ^b	531bp	176AS	5
19.2295 ^b	525bp	174AS	4
19.5467 ^b	510bp	169AS	4
19.5700 ^b	510bp	169AS	4
19.6191 ^b	510bp	169AS	4
19.6337 ^b	531bp	176AS	5

Die ORF-Größe ist in Basenpaare (bp), die Proteingröße in Aminosäuren (AS) angegeben. Die Mitglieder der Unterfamilie A sind durch (^a)gekennzeichnet, die Gene der Unterfamilie B durch (^b).

Die Anzahl der EK-Motive in einem Cta2-Protein ist entscheidend für die Proteingröße. Vorallem für die Unterfamilie B lässt sich feststellen, dass die Cta2-Proteine, welche wenig EK-Motive enthalten wie 3074_Cta2 oder 362_Cta2, deutlich kleinere ORFs besitzen als die Cta2-Proteine mit 10 oder mehr EK-Motiven. Die größte festgestellte Anzahl der EK-Motive liegt bei 12 und ist bei drei der Cta2-A-Proteine zu beobachten (631_Cta2, 4054_Cta2, 6112_Cta2, Tabelle 3). Das größte Cta2-Protein mit einer Größe von 273 Aminosäuren wird vom ORF 19.7680 kodiert. Allerdings weist dieses Protein nur 10 EK-Motive auf (Tabelle 12). In der Unterfamilie B gibt es nur geringe Unterschiede in der Anzahl der Wiederholungsmotive. Die Zahl liegt bei vier oder fünf. Damit einhergehend sind diese Protein auch in ihrer Größe sehr ähnlich, keines der B-Proteine ist größer als 176 Aminosäuren (Tabelle 12).

4.3.2. Die meisten CTA2-Gene liegen in der Nähe der Telomere der Chromosomen

Da die CTA2-Gene äußerst hochkonserviert sind und damit eine repetitive Genfamilie darstellen, war es von Interesse herauszufinden, wo die einzelnen ORFs auf den Chromosomen lokalisiert sind. Anhand des annotierten *C. albicans* Genoms konnte festgestellt werden, dass die Mehrzahl der CTA2-Gene in der Nähe der Telomere an den Enden der Chromosomen liegen (Braun et al., 2005, Tabelle 13). Jedes Chromosom besitzt an mindestens einem Ende einen ORF, der für ein Cta2-Protein kodiert. Bei den Chromosomen 1, 3, 4 und 5 sind an beiden Enden jeweils CTA2-Gene zu finden. Als bisher einziges CTA2-Gen liegt der ORF 19.2661 nicht an einem Telomer, sondern inmitten des Chromosoms 1 (Tabelle 13). Bei der betreffenden Region sind die Annotierungsarbeiten jedoch noch nicht abgeschlossen.

Tabelle 13. Lage der CTA2-Gene auf den Chromosomen.

Chromosom	5'Telomer	3'Telomer	Andere Lokalisierung
R	7544_CTA2	-	-
1	6112_CTA2	ORF 19.7276 ^a	2661_CTA2
2	1925_CTA2	-	-
3	5467_CTA2	6191_CTA2	-
4	362_CTA2	3074_CTA2	-
5	5700_CTA2	4054_CTA2	-
6	6337_CTA2	-	-
7	-	ORF 19.7127.5 ^a	

Die Lage der Gene wurde mit dem annotierten *C. albicans* Genom (<http://candida.bri.nrc.ca/candida>) ermittelt. Alle Chromosomen tragen an mindestens einem Telomer ein CTA2-Gen. Für die ORFs 19.631, 19.7680 und 19.2295 konnte in der Genomsequenz keine Lokalisierung auf den Chromosomen bestimmt werden. Die mit ^a gekennzeichneten ORFs 19.7276 und 19.7127.5 kodieren ebenfalls für Proteine mit MPEN-Starts, aber die ORFs wurden nicht weit genug sequenziert, so dass keine Aussagen über die Stoppcodons möglich sind. Beide liegen aber in der Nähe der Telomere der jeweiligen Chromosomen.

Der *C. albicans* ORF 19.2661 kodiert für ein Cta2-Protein und ist bisher der einzige ORF der *CTA2*-Familie, welcher nicht am Telomer, sondern in den inneren Bereichen eines Chromosoms annotiert wurde (Tabelle 13, Abbildung 25A). Über die ORFs, welche aufwärts und abwärts von 19.2661 liegen, ist nicht bekannt, für welches Protein sie kodieren.

Bei einer detaillierteren Betrachtung der Nachbarschaftsverhältnisse des Gens *6191_CTA2* konnte festgestellt werden, dass es nicht nur sehr nahe am Telomer von Chromosom 3 liegt (Tabelle 13, Abbildung 25B), sondern dass es auch den vorletzten ORF vor dem Telomer darstellt. Lediglich der ORF 19.6192 liegt noch näher am Ende des Chromosoms (Abbildung 25B). Über die Funktion in *C. albicans* oder eventuelle Orthologe in *S. cerevisiae* ist weder für 19.6191 noch 19.6192 etwas bekannt. Der aufwärts von *19.6191_CTA2* gelegene ORF 19.6190 ist ortholog zum *S. cerevisiae* Gen *PSA1*, welches für eine Mannose-1-Phosphatguanyltransferase kodiert.

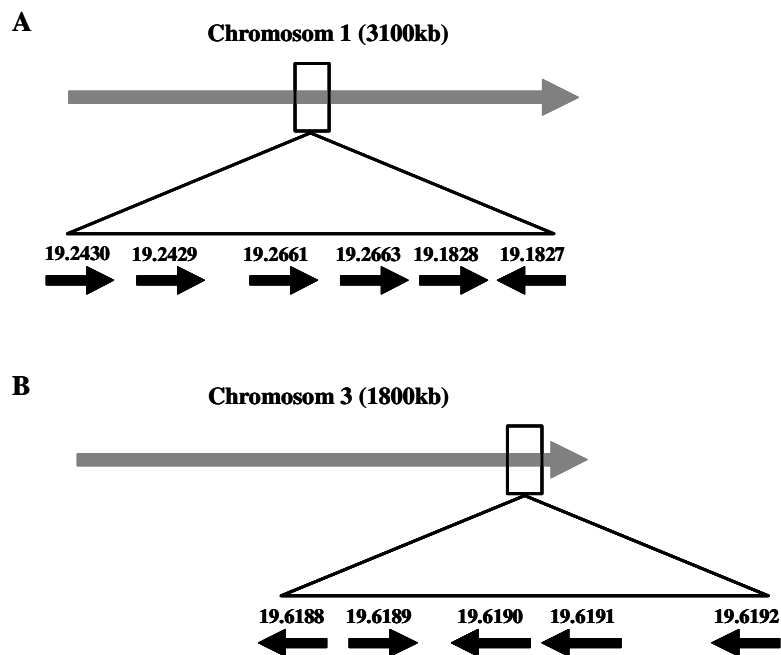


Abbildung 25. Lage von 2661_CTA2 und 6191_CTA2 auf den Chromosomen.

Die Lage der *CTA2*-ORFs und der benachbarten offenen Leserahmen wurde der Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org>) entnommen. (A) 2661_CTA2 liegt in der mittleren Region von Chromosom 1. (B) 6191_CTA2 liegt in der Nähe des Telomers von Chromosom 3.

4.3.3. Expressionsversuche mit *lacZ*

Um die Expression der Gene *2661_CTA2* und *6191_CTA2* zu untersuchen, wurden die Promotoren der beiden Gene mit dem *lacZ*-Gen aus *Streptococcus thermophilus* fusioniert. Dafür wurden die Plasmide pAU-6191_CTA2p-lacZ-URA3 und pDrive-2661_CTA2-lacZ-URA3 hergestellt. Diese wurden linearisiert und in verschiedene *C. albicans* Stämme transformiert. Die ortsspezifische Integration der *lacZ*-Fusionen wurde über PCR nachgewiesen (Abbildung 26).

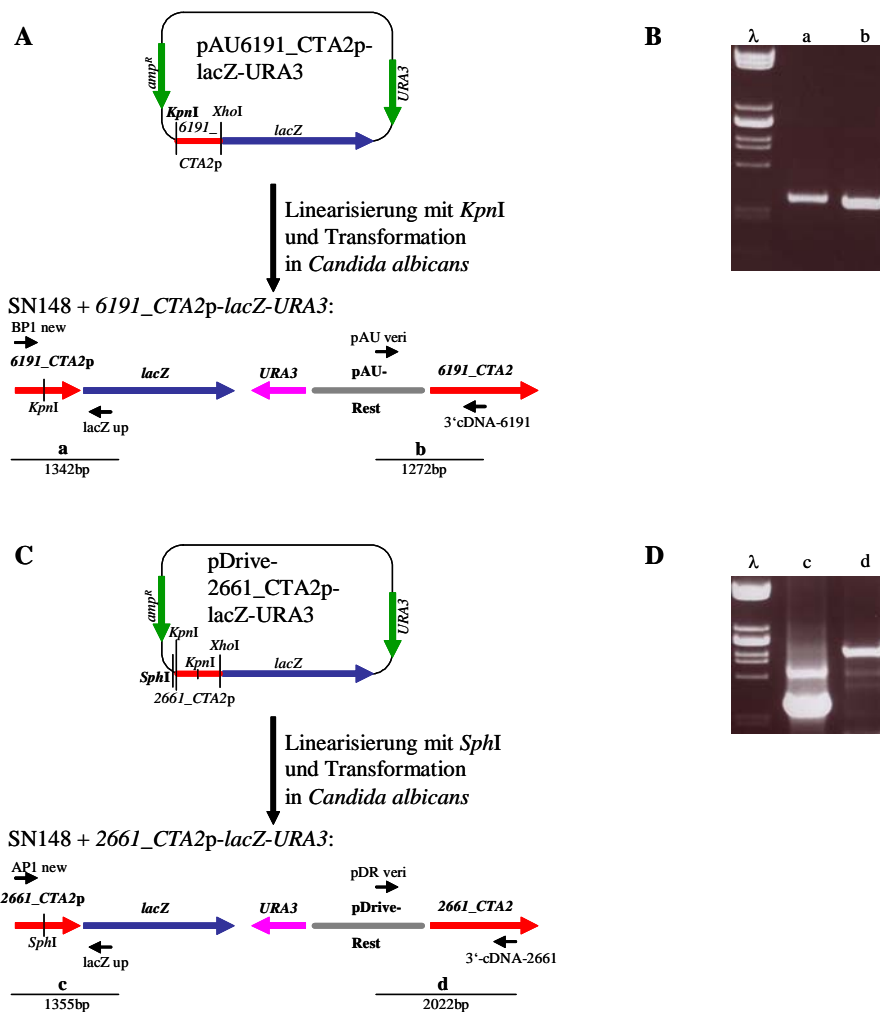


Abbildung 26. Konstruktion und Verifizierung der *C. albicans* Stämme mit der *CTA2p-lacZ-URA3*-Fusion.

(A) Mit Oligonukleotidprimern wurde vom *6191_CTA2*-Promotor die ersten 500bp vor dem Startkodon amplifiziert und in pDrive zwischenkliert (siehe Material und Methoden). Aus diesem Plasmid wurde der Promotor über *KpnI/XhoI* in pAU36 (Uhl und Johnson, 2001) kloniert und ersetzte dort den *CaACT1*-Promotor, so dass das Plasmid pAU-6191_CTA2p-lacZ-URA3 entstand. Dieses Plasmid wurde mit *KpnI* linearisiert und in verschiedene *C. albicans* Stämme transformiert, wo es in den Promotor von *6191_CTA2* eingebaut wurde. (B) Diese Integration wurde am 5'-Ende mit den Primern BP1new und lacZ up nachgewiesen, welche die Fusion von *lacZ* und Promotor zeigten. Am 3'-Ende konnte mit den Primern pAUveri und 3'-cDNA-6191 gezeigt werden, dass der Plasmidrest vor den ORF von *6191_CTA2* integriert wurde. (C) In das Plasmid pDrive wurden ein 1140bp großer Promotor von *2661_CTA2*, das *SilacZ*-Gen und *CaURA3* eingefügt. Dieses Plasmid wurde mit *SphI* linearisiert und in *C. albicans*

transformiert. Dort wurde es in den Promotor von 2661_CTA2 integriert. (D) Zum Nachweis der 2661_CTA2p-*lacZ*-Fusion in *C. albicans* wurden das 5'-Ende des eingefügten Plasmids (c) und das 3'-Ende (d) über PCR mit den angegebenen Primern nachgewiesen. Die unspezifischen Banden können Artefakte der übrigen CTA2-Gene sein, in denen die verwendeten Primer zum Teil binden konnten.

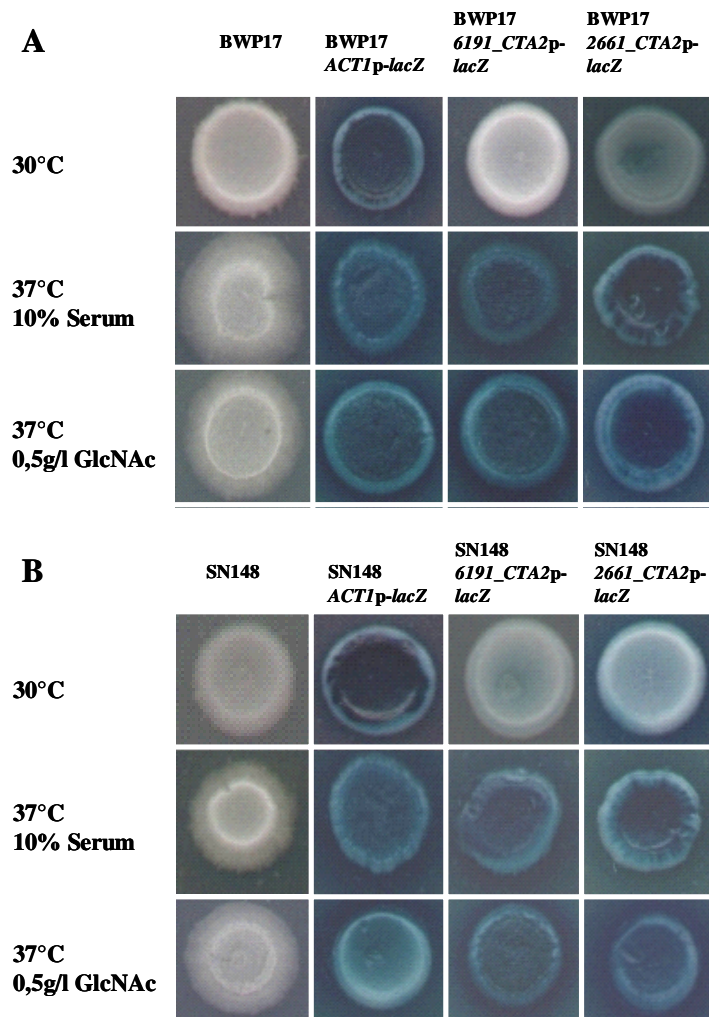


Abbildung 27. Expression des *lacZ*-Gens unter der Kontrolle der CTA2-Promotoren.

Die Expression von *lacZ* wurde in den Stämmen BWP17 (A) und SN148 (B) untersucht. Die Stämme ohne *lacZ*-Gen und die Derivate in denen dieses Gen unter Kontrolle der Promotoren von *CaACT1*, *6191_CTA2* und *2661_CTA2* stand wurden über Nacht in YPD bei 30°C angezogen und anschließend mit frischem YPD-Medium verdünnt und nochmals für 4h bei 30°C inkubiert. Von diesen Kulturen wurden je 5µl auf XMM-Platten getropft, welche X-Gal enthielten. BWP17, SN148 und die zugehörigen Derivate wurden auf jeweils dieselben Platten aufgetropft. Für die Induktion des filamentösen Wachstums enthielten die Platten entweder 10% Serum oder 0,5g/l N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Die Platten wurden 4 Tage bei 30°C beziehungsweise 37°C inkubiert und anschließend fotografiert.

Zur Analyse der Aktivität der CTA2-Promotoren wurden die Stämme, in denen sich das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle der Promotoren von *CaACT1*, *6191_CTA2* und *2661_CTA2* befand, auf Minimalfestmedien mit X-Gal getestet. Dabei zeigte die Stärke der Blaufärbung an, wie stark das *lacZ*-Gen in diesem Stamm exprimiert wurde. Getestet wurde die Expression während des Hefewachstums (30°C) und des

filamentösen Wachstums (37°C, wobei entweder Serum oder N-Acetylglucosamin als Induktionsmittel dienten). Die Stämme ohne *lacZ*-Gen zeigten unter diesen Bedingungen keine Blaufärbung, da auch keine β -Galactosidase vorhanden war. Die Stämme mit den *ACT1p-lacZ*-Konstrukten zeigten unter allen Bedingungen und in allen Stammhintergründen eine nahezu gleiche Blaufärbung (Abbildung 27). Die Expression von *lacZ* unter Kontrolle des *6191_CTA2*-Promotors zeigte hingegen Unterschiede. Bei 30°C gab es in BWP17 keine beobachtbare Blaufärbung, während SN148 leicht blau angefärbt waren (Abbildung 27). In den Stämmen BWP17 und SN148 gab es unter Hypheninduktionsbedingungen jedoch eine deutliche Zunahme der Blaufärbung, was zeigte, dass die Expression von *6191_CTA2p-lacZ* deutlich gesteigert wurde (Abbildung 27). Für die Stämme mit den *2661_CTA2p-lacZ*-Konstrukten konnte in BWP17 und SN148 schon bei 30°C eine recht deutliche Blaufärbung festgestellt werden. Unter Hypheninduktionsbedingungen zeigten die Stämme mit *2661_CTA2p-lacZ* eine starke Blaufärbung (Abbildung 27). Damit konnte gezeigt werden, dass während des filamentösen Wachstums die Expression von *CTA2*-Genen gesteigert wurde.

4.3.4. Quantitative Bestimmung der Aktivität der *CTA2*-Promotoren mit *CaVENUS-YFP*

Für die Bestimmung der Expression der *CTA2*-Promotoren in den Zellen wurden diese mit dem *CaVENUS*-Gen fusioniert, welches für eine optimierte Variante des gelbfluoreszierenden Proteins (YFP) kodiert. In den bereits für die Versuche mit β -Galactosidase verwendeten Plasmiden wurde das *lacZ*-Gen gegen *CaVENUS* ausgetauscht. Die dabei hergestellten Plasmide wurden mit *KpnI* linearisiert und in den *C. albicans* Stamm BWP17 transformiert (Abbildung 28). Die auf diese Weise erzeugten Mutanten trugen Fusionen, in denen *CaVENUS* entweder unter Kontrolle des *CaACT1*-Promotors oder der beiden *CTA2*-Promotoren stand. Die Aktivität der Promotoren wurde unter *in-vivo*-Bedingungen sowohl in Flüssigkulturen bei 30°C und 37°C als auch auf Blinddarmepithel vom Schwein untersucht. Neben den BWP17-Derivaten mit den unterschiedlichen Promotor-Konstrukten wurde der Wildtyp SC5314 als Kontrolle mitgeführt.

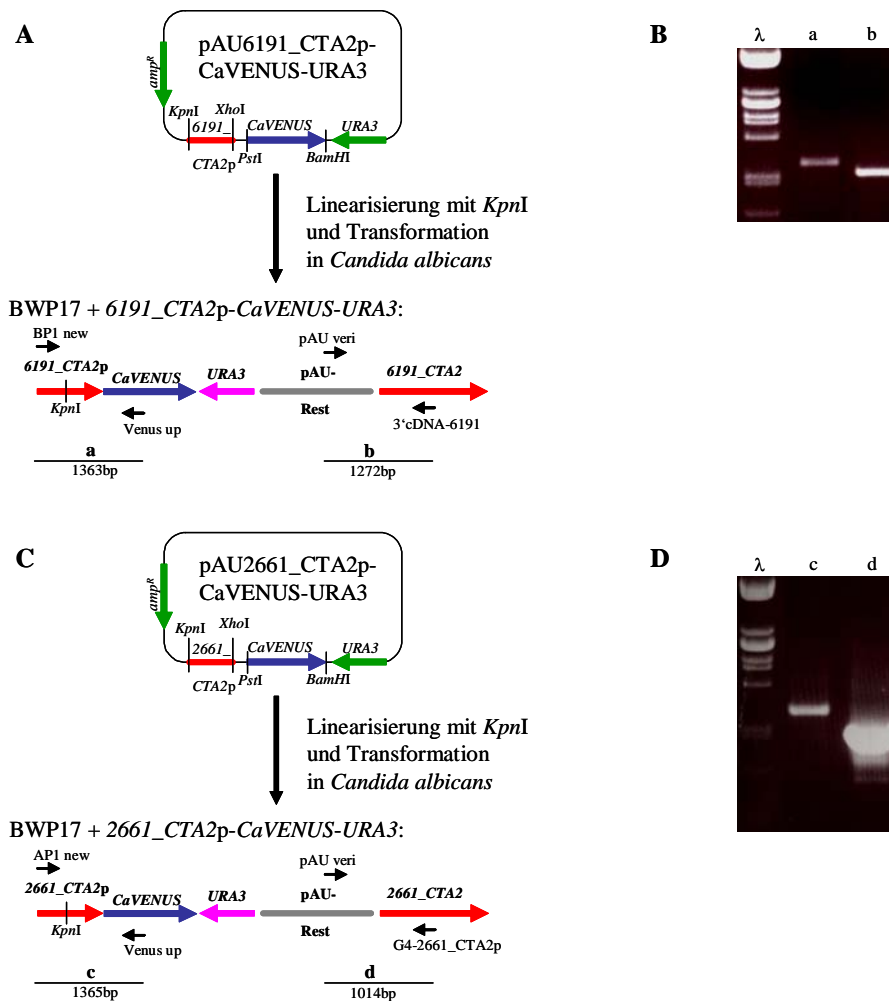


Abbildung 28. Konstruktion und Verifizierung der *C. albicans* Stämme mit der CTA2p-CaVENUS-URA3-Fusion.

(A) Im bereits beschriebenen Plasmid pAU-6191_CTA2p-lacZ-URA3 wurde das *lacZ*-Gen durch das *CaVENUS*-Gen über eine *PstI*/*BamHI*-Klonierung ersetzt. Das somit hergestellte Plasmid pAU-6191_CTA2p-CaVENUS-URA3 wurde mit *KpnI* linearisiert und anschließend in *C. albicans* transformiert. (B) Diese Integration wurde am 5'-Ende mit den Primern BP1new und Venus up nachgewiesen, welche die Fusion von CaVENUS-YFP und Promotor zeigten (a). Am 3'-Ende konnte mit den Primern pAUveri und 3'cDNA-6191 gezeigt werden, dass der Plasmidrest vor den ORF von 6191_CTA2 integriert wurde (b). (C) Im Plasmid pAU-6191_CTA2p-CaVENUS-URA3 wurde über eine *KpnI*/*XhoI*-Klonierung 6191_CTA2p gegen ein 500bp großes Fragment des 2661_CTA2-Promotors ersetzt, so dass das Plasmid pAU-2661_CTA2p-CaVENUS-URA3 hergestellt werden konnte. Dieses Plasmid wurde ebenfalls über *KpnI* linearisiert und in *C. albicans* transformiert. (D) Zum Nachweis der 2661_CTA2p-CaVENUS-Fusion in *C. albicans* wurden das 5'-Ende des eingefügten Plasmids (c) und das 3'-Ende (d) über PCR mit den angegebenen Primern nachgewiesen.

Dieser zeigte unter allen drei getesteten Bedingungen nur eine sehr geringe Eigenfluoreszenz, die hauptsächlich auf das benutzte Medium zurückzuführen war (Abbildung 29). Der BWP17-Stamm mit dem *ACT1p*-*CaVENUS*-Konstrukt zeigte unter allen drei Bedingungen ein sehr starkes Fluoreszenzsignal (Abbildung 29). Eine quantitative Analyse dieser Fluoreszenz zeigte, dass sowohl in Hefen (30°C) als auch in Hyphen (37°C+ Serum, 37°C+Epithel) die Intensität des YFP-Signals annähernd gleich

war (Tabelle 14). Für den *6191_CTA2p-CaVENUS*-Stamm konnte beobachtet werden, dass bei der Induktion von Hyphen zu einem Anstieg der Fluoreszenz kam (Abbildung 30). Dabei war zwischen Hefezellen und Hyphen, die durch Serum induziert wurden, eine Verdreifachung der Intensität der YFP-Fluoreszenz in den Hyphen zu beobachten (Tabelle 14). Bei der Induktion auf dem Schweinedarmepithel war diese Steigerung in diesem Maß jedoch nicht nachzuweisen (Abbildung 29). Der *2661_CTA2p-CaVENUS*-Stamm zeigte schon in Hefezellen eine deutlich höhere YFP-Fluoreszenz als der Stamm mit dem *6191_CTA2*-Promotor (Abbildung 29). In Hefezellen war die YFP-Intensität dreimal so hoch, wenn *CaVENUS* unter Kontrolle des *2661_CTA2*-Promotors stand (Tabelle 14). Wurde dieser Stamm mit Serum induziert, dann zeigten die Hyphen eine verdoppelte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Hefezellen (Tabelle 14). Auf dem Schweinedarmepithel zeigten die Hyphen ebenfalls eine gesteigerte YFP-Fluoreszenz, die allerdings geringer als bei den seruminduzierten Hyphen von BWP17 + *2661_CTA2pCaVENUS* war (Tabelle 14).

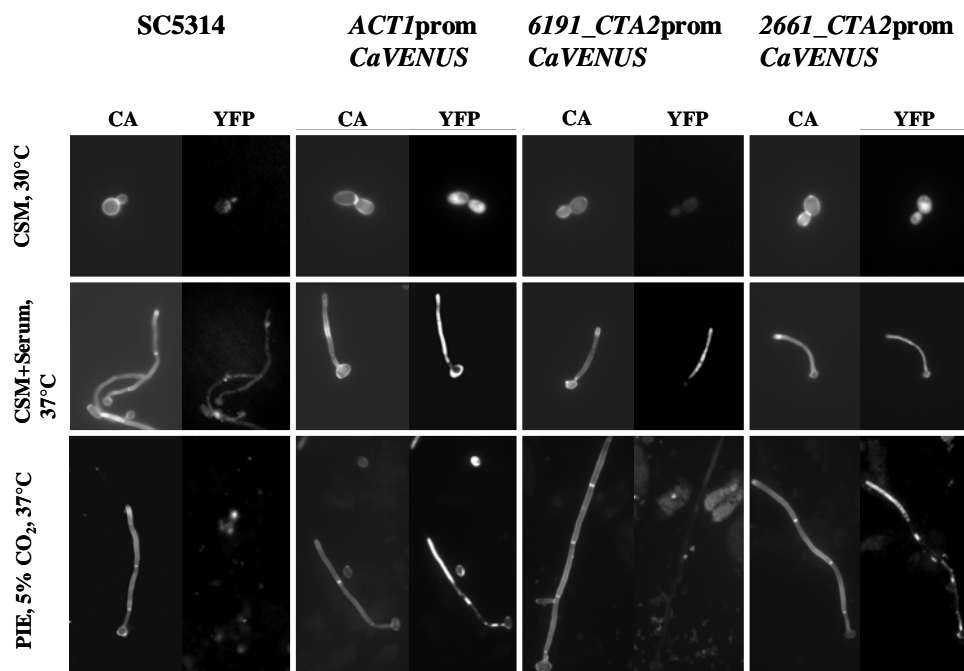


Abbildung 29. Analyse der Expression von *CTA2p-CaVENUS*-Konstrukten auf einem natürlichen Epithel.

Stationäre Kulturen der Stämme mit den verschiedenen *CaVENUS*-Konstrukten und dem Wildtyp wurden mit CSM-Minimalmedium auf eine $OD_{600}=0,3$ eingestellt und bei 30°C oder 37°C (CSM mit 10% Serum) für 4h inkubiert, danach mit Calcofluor gefärbt und mikroskopiert. Für den Versuch mit den Schweinedarmepithelien wurden die Zellen mit Wasser auf eine $OD_{600}=0,3$ eingestellt. Von diesen Lösungen wurde jeweils 1ml auf Stücken des Darmepithels getropft und anschließend für 4h bei 37°C und einer 5%-igen CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Größenbalken: 10µm.

Tabelle 14. Messung der Fluoreszenzintensitäten verschiedener *C. albicans* Stämme.

Stamm	CSM, 4h 30°C	CSM+ 10% Serum, 4h 37°C	PIE, 5% CO ₂ , 4h 37°C
SC5314	587 ± 29	597 ± 24	632 ± 35
ACT1pCaVENUS-URA3 ^a	15753 ± 1570	16296 ± 1304	16699 ± 2003
619I_CTA2pCaVENUS-URA3 ^a	841 ± 126	2913 ± 466	1042 ± 195
266I_CTA2pCaVENUS-URA3 ^a	2905 ± 282	6303 ± 701	4971 ± 446

Die mit ^a gekennzeichneten Stämme sind Derivate von BWP17. Die Messung wurde anhand der aufgenommenen Bilder mit der DNASTAR-Software vorgenommen (n=100).

4.3.5. Untersuchungen zur Ausschaltung der Expression von *CTA2*-Genen

Die meisten der *CTA2*-Gene liegen in der Nähe des Telomers. In anderen Organismen wurde bereits beschrieben, dass es zu einer telomerassoziierten Repression von Genen kommen kann. (Gottschling et al., 1990, Pirrotta und Gross, 2005). Diese Ausschaltung der Genexpression ist jedoch immer nur unter bestimmten Bedingungen zu beobachten, da sie in der Regel nur in einem Bruchteil der Zellkultur stattfindet. Um zu untersuchen, ob auch die *CTA2*-Gene durch einen Telomerpositionseffekt reguliert werden, wurden die Promotoren von *6191_CTA2* und *2661_CTA2* mit dem *CaURA3*-Gen fusioniert (Abbildung 30).

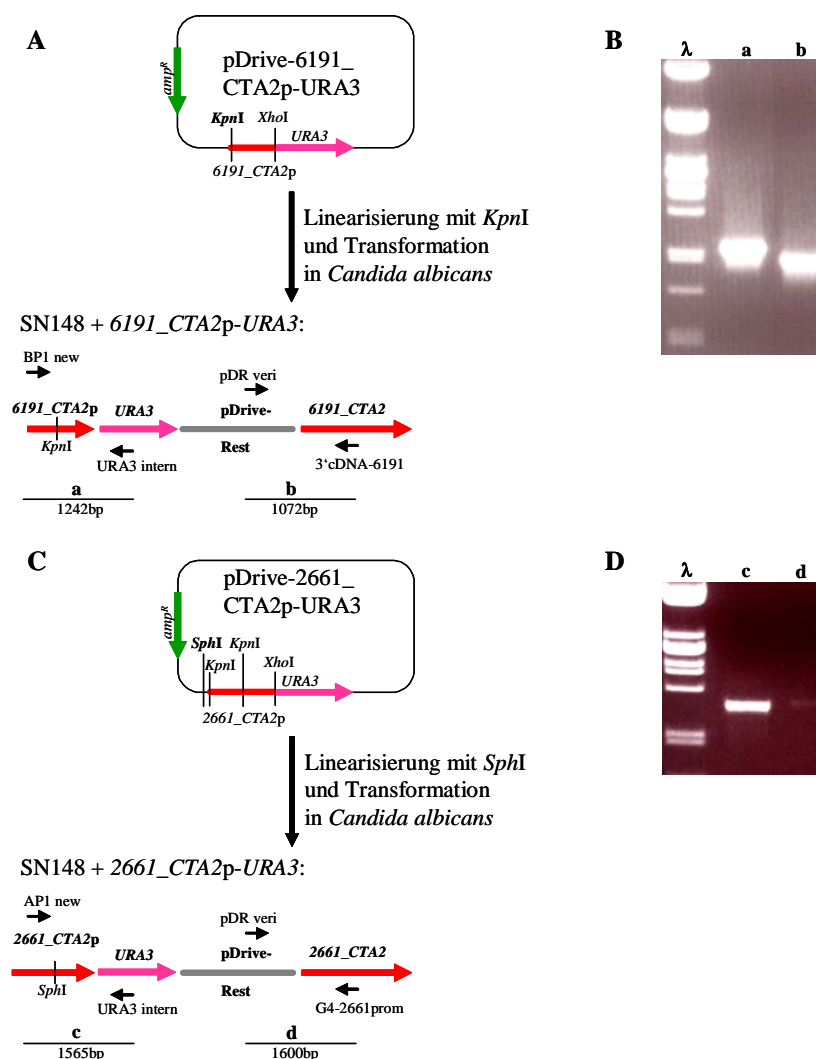


Abbildung 30. Konstruktion von pDrive-Plasmiden, in denen das *CaURA3*-Gen mit verschiedenen *CTA2*-Promotoren fusioniert wurde.

Das *CaURA3*-Gen wurde über PCR vom Ausgangsplasmid pFA-URA3 amplifiziert und am 5'-Ende mit einer *XhoI*-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einer *XmaI*-Schnittstelle versehen. Über diese beiden Schnitte wurde das Gen in die pDrive-Plasmide mit den Promotoren von *6191_CTA2* beziehungsweise *2661_CTA2* integriert. Damit wurde der *CaURA3*-ORF unter die Kontrolle der *CTA2*-Promotoren

gestellt. Diese entstandenen Plasmiden wurden linearisiert und in *C. albicans* transformiert (A, C). Die Integration der Plasmide wurde über diagnostische PCR nachgewiesen (B, D).

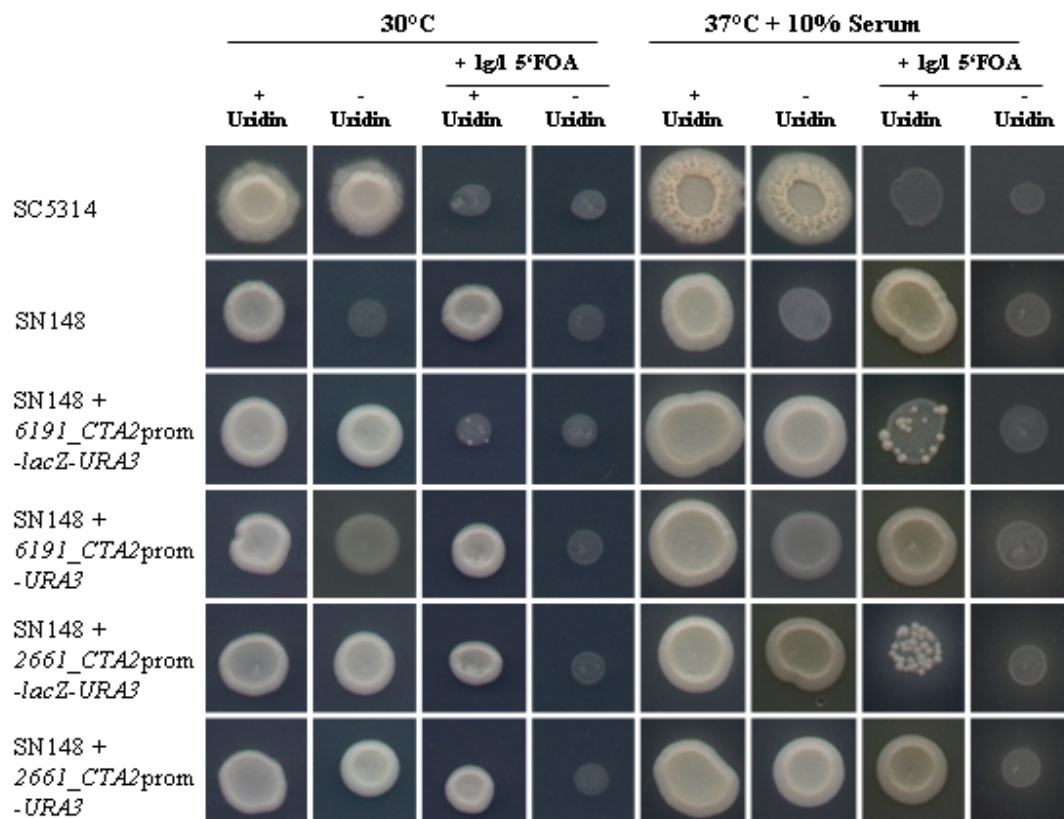


Abbildung 31. Ausschaltung der Genexpression von 6191_CTA2 und 2661_CTA2.

Zellen logarithmischer Kulturen der angezeigten Stämme wurden auf die Platten aufgetropft und für 4 Tage bei 30°C oder 37°C inkubiert bevor sie fotografiert wurden. Wenn im Medium 5-FOA enthalten war konnten Zellen, die das *URA3*-Gen exprimierten nicht wachsen. Als Kontrolle dienten hierfür SC5314, welcher das *URA3*-Gen besitzt und SN148, der eine *Aura3*-Mutante ist.

Die Plasmide wurde linearisiert und in *C. albicans* SN148 transformiert. Die daraus resultierenden Mutanten wurden anschließend auf ihre Sensitivität gegen 5-Fluorotische Säure (5-FOA) getestet. Diese Substanz wirkt selektiv toxisch gegen Zellen, in denen das *URA3*-Gen aktiv ist. Zum Vergleich wurden der *C. albicans* Wildtyp SC5314, SN148 sowie dessen Derivate mit den 6191_CTA2p-lacZ-CaURA3-, 6191_CTA2p-CaURA3, 2661_CTA2p-lacZ-CaURA3- und 2661_CTA2p-CaURA3-Konstrukten verwendet. Die Versuche wurden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, um eventuelle Unterschiede durch die Aktivität der *CTA2*-Promotoren in Hefezellen und Hyphen zu beobachten. Der Wildtyp SC5314 wuchs bei beiden Bedingungen gleich gut. In Gegenwart von 5-FOA im Medium gab es jedoch kein Wachstum. Da in diesem Stamm *CaURA3* immer exprimiert wurde, wirkte das 5-FOA auf alle Zellen toxisch (Abbildung 31). Der Ausgangsstamm für die Transformationen SN148 konnte nur

wachsen, wenn sich Uridin im Medium befand, da er das *CaURA3*-Gen nicht exprimiert. Dafür wuchs dieser Stamm sowohl bei 30°C als auch unter Hypheninduktionsbedingungen und wenn sich 5-FOA im Medium befand. Hier bestätigte sich, dass *Δura3*-Stämme resistent gegen 5-FOA sind (Abbildung 31). Die SN148-Derivate mit den *CTA2p-lacZ-CaURA3*-Konstrukten zeigten bei beiden getesteten Temperaturen gleiches Wachstum, unabhängig von der Anwesenheit von Uridin im Medium. Auf Medien mit 5-FOA ohne Uridin konnten diese Stämme allerdings nicht wachsen. Für *6191_CTA2p-lacZ-CaURA3*-Stämme konnte auf 5-FOA-haltigen Medien unter beiden Bedingungen das Wachstum vereinzelter Kolonien beobachtet werden (Abbildung 31). Für den SN148-Stamm mit *2661_CTA2p-lacZ-CaURA3* wurde auf 5-FOA-Medien der gleiche Effekt festgestellt, nur dass das Wachstum der Zellen wesentlich besser war. Beide Stämme brauchten jedoch in Anwesenheit von 5-FOA Uridin in der Umgebung, sonst konnten sie nicht wachsen (Abbildung 31). Die SN148-Stämme mit den *CTA2p-CaURA3*-Konstrukten zeigten sowohl bei 30°C als auch bei 37°C immer Wachstum. Die Expression der beiden *CTA2*-Promotoren war immer ausreichend, um die Selbstversorgung mit Uridin zu gewährleisten (Abbildung 31). Befand sich im Medium neben Uridin noch 5-FOA konnten sowohl *6191_CTA2p-CaURA3*- als auch *2661_CTA2p-CaURA3*-Stämme wachsen. Dieses Wachstum war deutlich besser als das der Mutanten mit den *CTA2p-lacZ-CaURA3*-Mutanten (Abbildung 31). Damit wurde gezeigt, dass es in *C. albicans* zu einer Ausschaltung der *CTA2*-Promotoren kommt, die unabhängig von Hefe- oder Hyphenwachstum ist und durch eine Fusion mit dem *CaURA3*-Gen und anschließender 5-FOA-Selektion sichtbar gemacht werden konnte.

Im Anschluss wurde untersucht, ob diese Genausschaltung reversibel ist. Dafür wurden von den Kolonien der *CTA2p-CaURA3*-Stämme auf 5-FOA-Platten Zellmaterial in YPD-Flüssigmedium gepickt und für 24h bei 30°C angezogen. Nach dieser Inkubation wurden Zellen dieser Kulturen auf Platten getropft, die entweder Uridin enthielten oder nicht. Die YPD-Inkubation für 24h wurde mit den Kulturen noch zweimal wiederholt, so dass am Ende die Zellen dreimal für 24h in YPD angezogen wurden. Nach den ersten 24h in YPD zeigten sowohl SN148+ *6191_CTA2p-CaURA3* als auch SN148+ *2661_CTA2p-CaURA3* Wachstum auf Platten mit Uridin. Fehlte dieses aber, dann konnte nur der Stamm mit dem *2661_CTA2p-CaURA3*-Konstrukt wachsen (Abbildung 32).

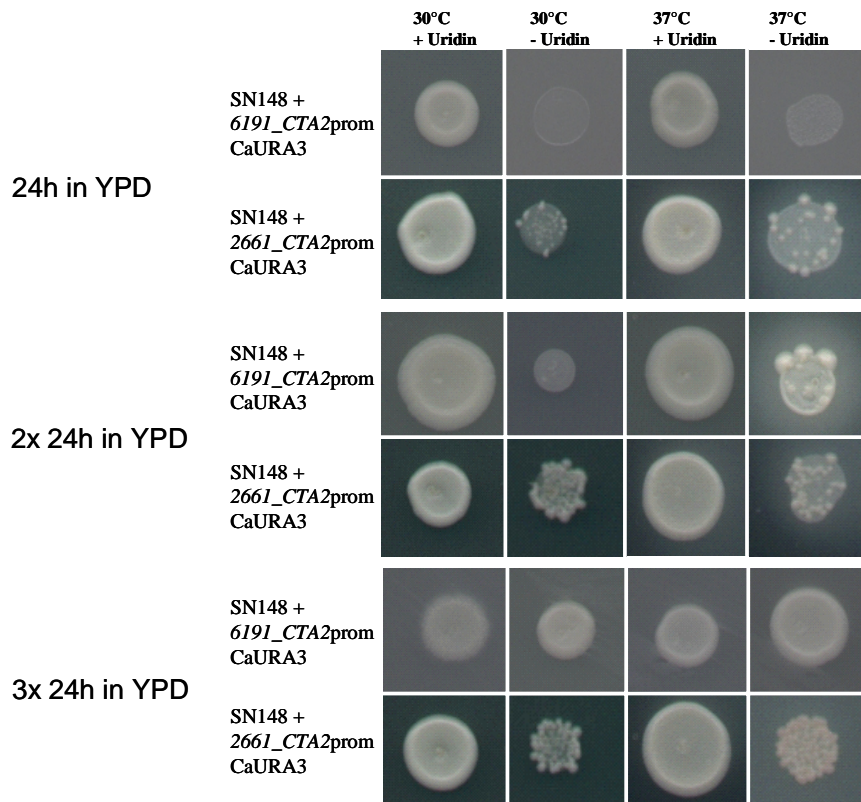


Abbildung 32. Reversion der Stilllegung der CTA2-Gene in *C. albicans*.

Zellen der angegebenen Stämme wurden von Kolonien von Platten mit 5-FOA (siehe Abbildung XX) gepickt und für 24h in YPD bei 30°C angezogen. Danach wurde von diesen Kulturen je 5µl auf Platten mit oder ohne Uridin getropft. Anschließend wurden die Platten für 2 Tage bei 30°C und 37°C inkubiert. Für die 37°C-Inkubation enthielten die Platten zusätzlich 10% Serum. Von der 24h YPD-Kultur wurden Zellen in frisches YPD überimpft und abermals für 24h bei 30°C angezogen und anschließend auf Platten getropft (2x 24h YPD). Der Vorgang wurde wiederholt (3x 24h YPD).

Nach zweimaliger Inkubation von 24h in YPD zeigten bereits beide Stämme Wachstum auf Platten ohne Uridin, so dass man davon ausgehen konnte, dass diese SN148-Derivate wieder das *CaURA3*-Gen exprimierten (Abbildung 32). Auch nach drei 24h Inkubationen in YPD zeigten die beiden Stämme Wachstum auf Platten mit und ohne Uridin. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen bei 30°C oder 37°C mit 10% Serum angezogen wurden (Abbildung 32). Damit konnte gezeigt werden, dass die Stilllegung der CTA2-Promotoren reversibel ist.

Für die Analyse dieser Genausschaltung war es von Interesse herauszufinden, wieviele der ursprünglich eingesetzten Zellen eigentlich die CTA2-Promotoren ausschalten. Zu diesem Zweck wurden SC5314 sowie die SN148-Derivate mit den *CTA2p-lacZ-CaURA* und den *CTA2p-CaURA3*-Varianten untersucht. Zellen der verwendeten Stämme wurden sowohl auf Platten ohne 5-FOA als auch auf Platten mit dem Zelltoxin ausplattiert. Anschließend wurde bestimmt, wieviele Kolonien der Stamm auf 5-FOA-Medium im Vergleich zu 5-FOA-freien Medium bildete. Aus diesem Verhältnis wurde

eine Überlebensrate bestimmt, die anzeigt in wievielen Zellen zum Zeitpunkt der Ausplattierung auf 5-FOA das von *CTA2*-Promotoren regulierte *CaURA3*-Gen nicht angeschaltet war (Abbildung 33). Dabei wurde festgestellt, dass vom Wildtyp SC5314 keine Zelle in der Lage war das *CaURA3*-Gen stillzulegen (Abbildung 33). Die Stämme mit den *CTA2p-lacZ*-Konstrukten zeigten eine geringe Überlebensrate. Für den Stamm SN148+ 6191_ *CTA2p-lacZ-CaURA3* lag diese bei 1%, für SN148+ 2661_ *CTA2p-lacZ-CaURA3* lag sie hingegen bei 13% (Abbildung 33). Diese Unterschiede waren jedoch auch schon auf den 5-FOA-Platten selbst zu sehen (Abbildung 32). Die Überlebensraten bei den *CTA2p-CaURA3*-Stämmen waren ungleich höher. Bei SN148+ 6191_ *CTA2p-CaURA3* überlebten 86% der eingesetzten Zellen die Behandlung mit 5-FOA. Für 2661_ *CTA2p-CaURA3* war diese Rate mit 65% zwar niedriger, sie lag aber immer noch bei dem über fünffachen der vergleichbaren Zellzahl der *CTA2p-lacZ-CaURA3*-Stämme (Abbildung 33).

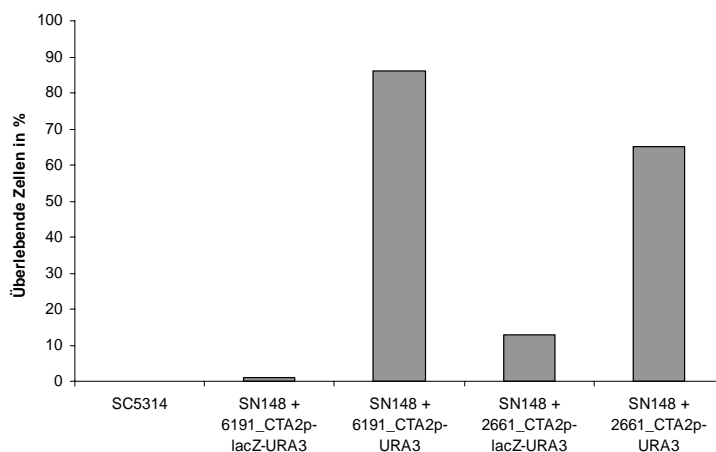


Abbildung 33. Überlebensrate von Stämmen mit verschiedenen *CTA2*-Promotor-Konstrukten in Anwesenheit von 5-FOA.

Die angezeigten Stämme wurden über Nacht in YPD-Vollmedium bei 30°C angezogen und anschließend mit frischem YPD verdünnt und nochmals für 4h bei 30°C inkubiert. Danach wurden verschiedene Verdünnungen der Kulturen entweder auf Platten mit CSM-Medium, 10% Serum und 1g/l 5-FOA oder auf CSM-Platten mit 10% Serum, aber ohne 5-FOA ausplattiert und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Aus den gewachsenen Kolonien wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde der Anteil der Zellen berechnet, die auf 5-FOA gewachsen waren im Vergleich zur eingesetzten Gesamtzellzahl. Dieser Anteil wurde in Prozent errechnet und graphisch dargestellt.

4.3.6. Die Zugabe von Trichostatin A verhindert die Stilllegung der *CTA2*-Gene nicht

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie die Stilllegung der *CTA2*-Expression reguliert wird. Dabei sollte zunächst analysiert inwieweit Histondeacetylasen bei der Ausschaltung der Expression beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde Trichostatin A, eine Substanz, welche die Aktivität bestimmter Histondeacetylasen inhibiert, ins Medium gegeben. Anschließend wurde das Wachstum der *C. albicans* Stämme untersucht, wobei die Unterschiede zwischen Platten ohne 5-FOA und mit 5-FOA von Interesse waren. Untersucht wurden die Stämme SC5314, BWP17, SN148 sowie die Derivate der beiden letzteren in denen das *CaURA3*-Gen unter Kontrolle der *CTA2*-Promotoren stand. Ohne Trichostatin A im Medium wuchsen alle Stämme unter den getesteten Bedingungen. Wurde zusätzlich 5-FOA ins Medium gegeben, so zeigte der *C. albicans* Wildtyp SC5314 kein Wachstum mehr. BWP17 und SN148 bildeten Kolonien aus, die annähernd so groß waren wie auf Platten ohne 5-FOA (Abbildung 34).

Die Stämme mit den *6191_CTA2p-CaURA3*-Konstrukten zeigten unter den Bedingungen mit 5-FOA stark reduziertes Wachstum. Für den Stamm mit dem *2661_CTA2p-CaURA3*-Konstrukt wurden im Gegensatz dazu keine wesentlichen Wachstumsunterschiede zwischen Platten mit 5-FOA und ohne diese Substanz festgestellt (Abbildung 33). Die Zugabe von 10µM Trichostatin A ins Medium änderte am Wachstumsverhalten der untersuchten Stämme nichts. Wurde zusätzlich 5-FOA zugefügt, zeigte SC5314 kein Wachstum, während die Stämme mit den *CTA2p-CaURA3*-Konstrukten wiederum Kolonien ausbildeten, die von Größe und Anzahl dem Wachstum auf 5-FOA-Medium ohne Trichostatin A entsprach. Keinen Einfluss hatte die Zugabe von dieser Substanz auf das Verhalten von BWP17 und SN148 in Gegenwart von 5-FOA (Abbildung 34). Auch eine Erhöhung der Konzentration von Trichostatin A auf 50µM zeigte keinen Einfluss auf die Fähigkeit der *CTA2p-CaURA3*-Stämme unter 5-FOA-Selektionsbedingungen durch Ausschalten des *CTA2*-Promotors die Expression des *CaURA3*-Gens zu stoppen (Abbildung 34). Damit wurde gezeigt, dass die Zugabe von Trichostatin A die Ausschaltung der *CTA2*-Expression unter bestimmten Selektionsbedingungen nicht beeinflusst

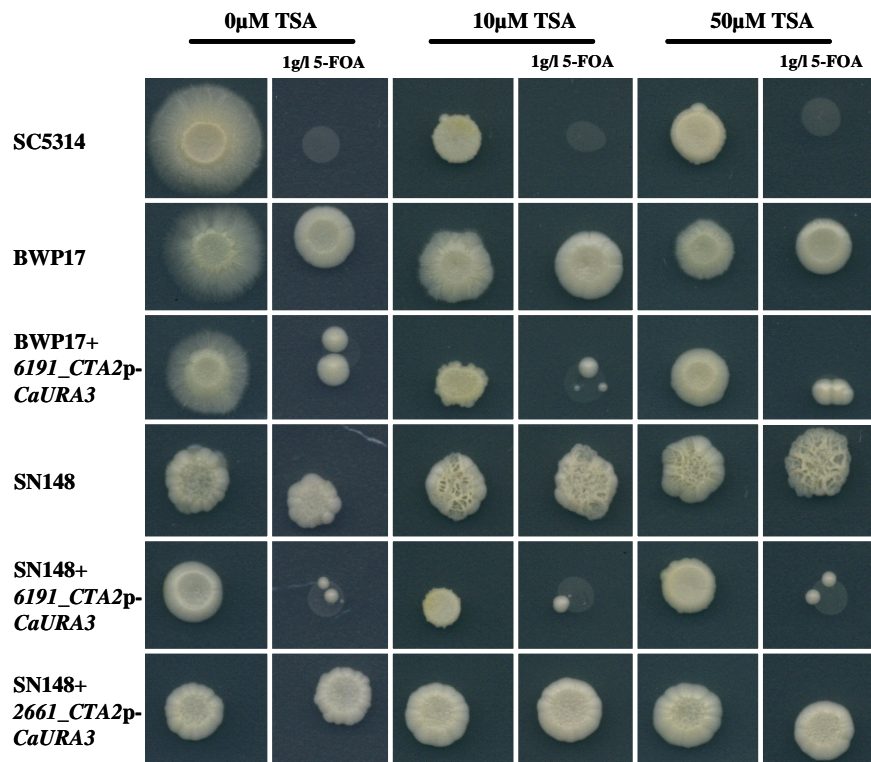


Abbildung 34. Die telomerassoziierte Stilllegung von 6191_CTA2 ist unabhängig von Trichostatin A (TSA).

Die angezeigten Stämme wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf Minimalmediumplatten mit Uridin, 10% Serum und den angegebenen TSA-Konzentrationen mit oder ohne 1g/l 5-FOA aufgetropft und für 2 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend fotografiert.

4.3.7. Die telomerassoziierte Stilllegung von 6191_CTA2 ist unabhängig von der Histondeacetylase Hda1.

Um genauere Kenntnisse über die Regulation der CTA2-Stilllegung zu erhalten, wurde das Gen *CaHDA1*, welches für eine Histondeacetylase kodiert, deletiert. Die *hda1/hda1*-Stämme mit der 6191_CTA2p-URA3-Kassette wurden anschließend auf ihr Wachstum in Gegenwart von 5-FOA getestet. Zum Vergleich wurden der Wildtypstamm SC5314 und der Ausgangsstamm für die Transformationen SN148 ebenfalls untersucht. Wie bereits in der vorangegangenen Abschnitten beschrieben, wurde für SC5314 kein Wachstum auf 5-FOA-haltigen Medien beobachtet, während der Stamm ansonsten unter allen Bedingungen Wachstum zeigte (Abbildung 35). Im Gegensatz dazu konnte der Deletionsstamm SN148 in Anwesenheit dieser Substanz wachsen, da er kein URA3-Gen enthielt. Der Stamm SN148 + 6191_CTA2p-URA3 zeigte auf Medien mit 5-FOA das Ausschalten der URA3-Expression wie bereits beschrieben (Abbildung 35). Für den Stamm SN148 + 6191_CTA2p-URA3 + $\Delta hda1$

konnten wie für SN148 + *6191_CTA2p-URA3* Kolonien auf Platten mit 5-FOA beobachtet werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen unter Hefewachstums- oder Hypheninduktionsbedingungen wuchsen (Abbildung 35).

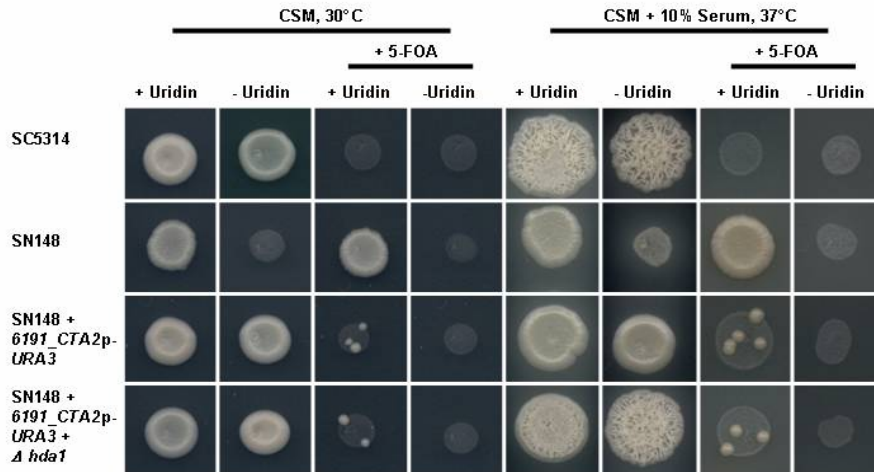


Abbildung 35. Die telomerassoziierte Stilllegung von *6191_CTA2* ist unabhängig von der Histondeacetylase Hda1.

Die angezeigten Stämme wurden nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf Platten mit oder ohne Uridin und mit oder ohne 1g/l 5-FOA getropft. Für die Hypheninduktion enthielten die Platten zusätzlich 10% Serum. Die Ansätze wurden anschließend für 4 Tage bei 30°C oder 37°C inkubiert und danach fotografiert.

4.3.8. Untersuchungen zum Telomerpositionseffekt in *C. albicans*

In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Entfernung eines ORFs vom Telomer entscheidend dafür ist, ob die durch die Telomernähe hervorgerufenen Stilllegungseffekte wirken oder nicht. In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass es zur Ausschaltung der *URA3*-Expression kommen kann, wenn dieses Gen unter der Kontrolle des *6191_CTA2*-Promotors steht und am Lokus dieses *CTA2*-ORFs integriert wurde. Diese Stilllegungseffekte wurden in den *6191_CTA2p-lacZ-URA3*-Stämmen abgeschwächt. Zum einen war *URA3* unter der Kontrolle des eigenen endogenen Promotors, zum anderen wurde es durch das *lacZ* um mehr als 3kb vom *CTA2*-ORF entfernt. Um die telomervermittelte Expressionsausschaltung weiter abzuschwächen, wurde in die *6191_CTA2p-lacZ-URA3*-Stämme das Plasmid pRS415-*lacZ* eingefügt. Damit wurde der Abstand zwischen *6191_CTA2*-Promotor und *URA3* nochmals um mehr als 9kb vergrößert (Abbildung 36).

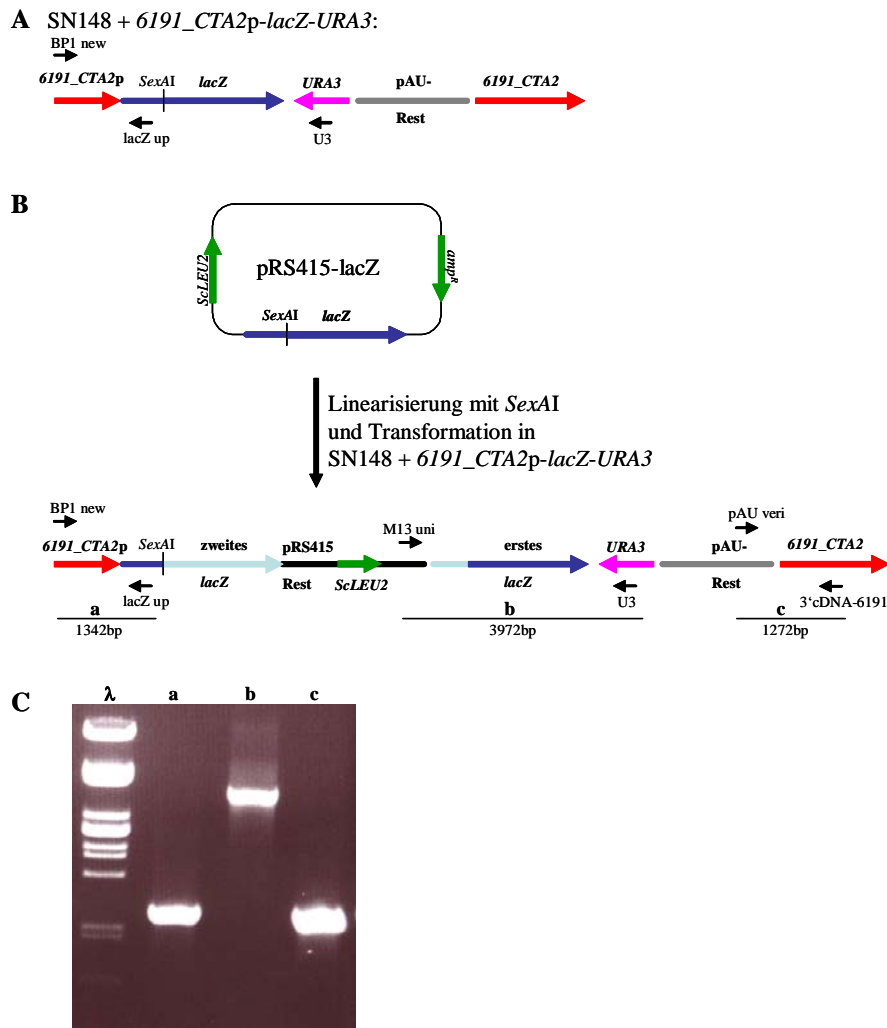


Abbildung 36. Herstellung und Verifizierung von SN148+ 6191_CTA2p-2xlacZ-URA3.

(A) Situation im Ausgangsstamm SN148+ 6191_CTA2p-lacZ-URA3. Das lacZ-Gen wurde im Plasmid pAU-6191_CTA2p-lacZ mit dem 6191_CTA2-Promotor fusioniert. Dieses Plasmid wurde linearisiert und in *C. albicans* SN148 transformiert. Damit wurde das lacZ-URA3-Konstrukt in den Promotor von 6191_CTA2 integriert. Auch der Rest des pAU-Vektors wurde vor den ORF des CTA2-Gens eingebaut.

(B) Das Plasmid pRS415-lacZ wurde mit der Restriktionsendonuklease SexAI linearisiert und in SN148+ 6191_CTA2p-lacZ-URA3 transformiert. Entsprechend der Homologien wurde das zweite lacZ-Gen samt pRS415-Rest (mit dem Selektionsmarker ScLEU2) in das erste lacZ-Gen eingebaut. Die Integration von pRS415-lacZ wurde über PCR nachgewiesen. Dafür wurde der Primer M13 uni verwendet, welcher nur im pRS415-Vektor bindet und U3, welcher ein Verifizierungsprimer für das bereits integrierte URA3-Gen ist. Das dadurch enthaltene PCR-Produkt umfasst Teile von pRS415, des ersten lacZ-Gens und des URA3-Markers. Die Größe beträgt 3972bp (C). Die Integration des ursprünglichen lacZ-Gens konnte durch die Primer BP1new und lacZ up nachgewiesen werden, mit welchen ein 1342bp Fragment amplifiziert werden konnte, welches Teile des 6191_CTA2-Promotors und von lacZ enthielt. Als Größenmarker bei der Gelelektrophorese wurde PstI-gespaltene λ-DNA verwendet. Das 3'-Ende des pAU-Konstrukts wurde mit den Primern pAUveri und 3'-cDNA-6191 nachgewiesen und hatte eine Größe von 1272bp. Mit den Primern M13 und U3 wurde die Integration von pRS415-lacZ in das bereits eingebaute pAU-lacZ-Konstrukt nachgewiesen, wie anhand der amplifizierten Bande von 3972bp zu sehen ist. Für die PCR wurde genomische DNA des Stammes SN148+ 6191_CTA2p-2xlacZ-CaURA3 genutzt.

Der somit erzeugte Stamm SN148+ *6191_CTA2p-2xlacZ-URA3* wurde anschließend darauf untersucht, inwieweit die telomervermittelte Expressionsausschaltung vermindert wurde. Zum Vergleich wurden SC5314, SN148 und dessen Derivate mit den *6191_CTA2p-lacZ-URA3*- und *6191_CTA2p-URA3*-Konstrukten verwendet. Diese Stämme wurden auf ihr Wachstum in Anwesenheit von 5-FOA getestet. Dabei zeigte der Wildtyp SC5314 auf Platten mit 5-FOA kein Wachstum, während der *Aura3*-Stamm SN148 unter diesen Bedingungen wachsen konnte (Abbildung 37). Die Mutante SN148+ *6191_CTA2p-URA3* zeigte in Gegenwart von 5-FOA Wachstum. Dieses war nicht so ausgeprägt wie bei SN148, wo sich bereits eine große Kolonie gebildet hatte und auch gegenüber den Platten ohne 5-FOA war das Wachstum abgeschächt (Abbildung 37). Der Stamm SN148+ *6191_CTA2p-lacZ-URA3* zeigte im Gegensatz dazu ein wesentlich schlechteres Wachstum auf Platten mit 5-FOA. Im Gegensatz zum SN148-Derivat, in welchem das *URA3*-Gen direkt unter Kontrolle des *CTA2*-Promotors stand wuchsen bei diesem Stamm lediglich sehr wenige kleine Einzelkolonien, was daraufhin weist, dass nur wenige Zellen die Expression von *URA3* ausschalten konnten (Abbildung 37). Für den Stamm, in dem der Abstand zwischen *CTA2*-Promotor und *URA3* durch das zusätzliche *lacZ*-Gen noch vergrößert wurde, konnte ein sehr schlechtes Wachstum in Gegenwart von 5-FOA beobachtet werden. Auch wuchsen nur vereinzelte sehr kleine Kolonien. Allerdings war der Unterschied zum Stamm mit nur einem *lacZ*-Gen nicht sehr groß (Abbildung 37).

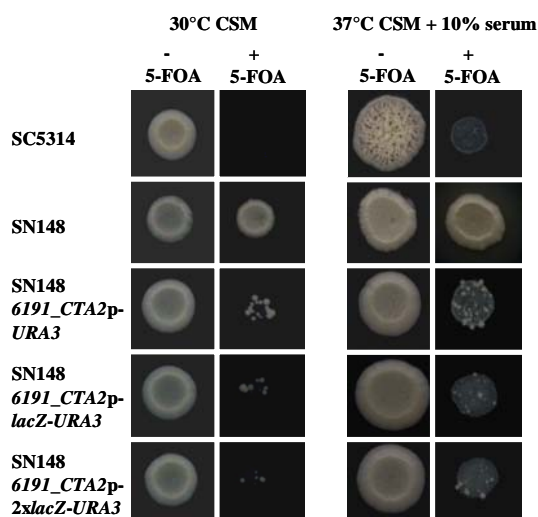


Abbildung 37. Analyse des Telomerpositionseffektes mit dem *C. albicans* ORF 19.6191

Die angezeigten Stämme wurden nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf Platten mit oder ohne 1g/l 5-FOA aufgetropft und für 4 Tage bei 30°C und 37°C inkubiert. Für den Versuch mit 37°C enthielten die Platten zusätzlich 10% Serum.

4.3.9. Das *C. albicans* Gen 2661_CTA2 kodiert für einen Transkriptionsaktivator

In den vorangegangenen Versuchen wurde analysiert, wie die Expression der zwei ausgewählten CTA2-ORFs gesteuert wird. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese Gene auch eine biologische Funktion in *C. albicans* ausführen. Dafür wurde das bereits etablierte 1-Hybrid-System verwendet. Dieses erlaubt Aussagen darüber, ob ein Gen für einen Transkriptionsaktivator oder einen –repressor kodiert (Russell und Brown, 2005). Zur Anwendung des 1-Hybrid-Systems wurden die ORFs 19.6191 und 19.2661 über PCR amplifiziert und mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *MluI* und *PstI* versehen. Über diese Schnitte wurden sie anschließend in das Plasmid mit *SalexA* integriert, so dass die Fusionen *SalexA-6191_CTA2* und *SalexA-2661_CTA2* entstanden. Diese Plasmide wurden linearisiert und in Stämme transformiert, welche ein *StlacZ*-Gen unter Kontrolle des *lexA*-Operators trugen (Abbildung 38A). Die so erhaltenen Stämme wurden auf Festmedien mit X-Gal untersucht. Zum Vergleich wurden der leere *SalexA*-Vektor, *SalexA-NRG1* und *SalexA-GCN4* genutzt. Der Stamm, welcher nur *SalexA* enthielt zeigte auf den X-Gal-Platten bei 30°C keine Blaufärbung. Ebenso zeigte die *SalexA-NRG1*-Mutante erwartungsgemäß keine Blaufärbung, da Nrg1 als Transkriptionsrepressor fungiert (Abbildung 38B). Der Stamm mit *SalexA-GCN4* zeigte eine intensive Blaufärbung und diente als Positivkontrolle, da Gcn4 bereits als Transkriptionsaktivator beschrieben wurde (Abbildung 38B, Russel und Brown, 2005). Die Mutanten mit den *SalexA-6191_CTA2*-Fusionen zeigten keine Blaufärbung, während sich für die *SalexA-2661_CTA2*-Stämme eine intensive blaue Anfärbung beobachten ließ, die auf eine erhöhte Aktivität der β -Galactosidase schließen ließ. Da die Intensität der Blaufärbung dem Niveau von *SalexA-GCN4* entsprach konnte damit nachgewiesen werden, dass das Genprodukt von 2661_CTA2 eine aktivierende Wirkung auf die Transkription besitzt (Abbildung 38B).

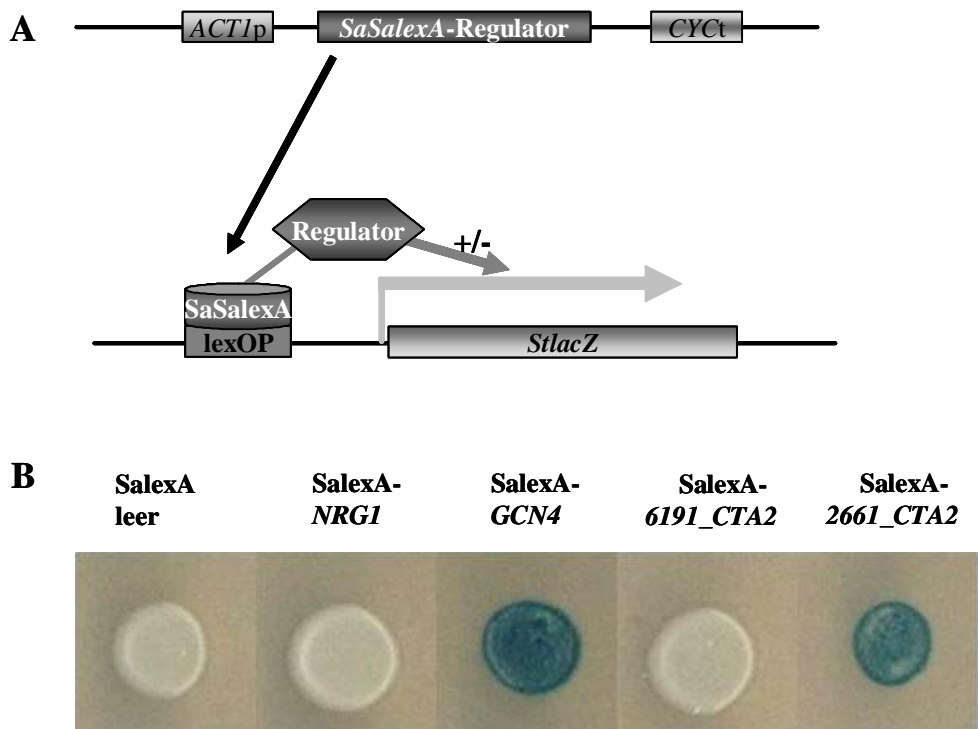


Abbildung 38. 2661_CTA2 kodiert für einen Transkriptionsaktivator in *C. albicans*.

(A) Schema über die Anwendung des 1-Hybrid-Systems in *C. albicans* (nach Russell und Brown, 2005). Das zu untersuchende vermutliche Regulatorgen wird mit dem *lexA*-Gen aus *Staphylococcus aureus* fusioniert, womit *SalexA*-Regulator entsteht. Dieses Konstrukt wird von einem *CaACT1*-Promotor reguliert und von einem *ScCYC1*-Terminator begrenzt. Dieses Konstrukt wird mit *StuI* linearisiert und in den *CaRPS1*-Lokus integriert. Das *SalexA*-Regulator-Fusionsprotein bindet an den *lex*-Operator und ist somit in der Lage, die Expression des *StlacZ*-Gens zu steuern. Handelt es sich bei dem Regulatorgen um einen Aktivator, so wird mehr β -Galactosidase hergestellt und die Zellen erhalten auf Festmedien mit X-Gal eine intensive Blaufärbung.

(B) Anwendung des 1-Hybrid-Systems. Die angezeigten Stämme wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in YPD bei 30°C angezogen und anschließend auf XMM-Platten aufgetropft. Diese Festmedien enthielten alle benötigten Aminosäuren und X-Gal (nach Uhl und Johnson, 2001). Die Platten wurden für 2 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend fotografiert. Der leere *SalexA*-Vektor und das *SalexA-NRG1*-Konstrukt zeigen wie die *Salex-6191_CTA2*-Stämme keine Blaufärbung. Die Stämme mit der *SalexA-2661_CTA2*-Fusion zeigen eine intensive Blaufärbung wie der *SalexA-GCN4*-Stamm. Gcn4 wurde bereits als Transkriptionsaktivator beschrieben (Russell und Brown, 2005).

5. Diskussion

5. Diskussion

5.1. Molekulare Analyse der *Candida albicans* Formingene *BNII* und *BNRI*

Die Steuerung des polaren Wachstums ist in allen Organismen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung. Alle drei Wachstumsformen von Pilzen werden durch die Prozesse während der Polarisierung geprägt. Dabei spielen die GTPasen der Ras- und Rho-Familie mit ihren Effektoren eine zentrale Rolle. In dieser Arbeit wurde im Speziellen die Funktion der Formine Bni1 und Bnr1 in *C. albicans* untersucht. Im Gegensatz zur Bäckerhefe *S. cerevisiae* und den filamentösen Ascomyceten *A. gossypii* und *A. nidulans* ist dieser Pilz ein dimorpher Organismus, der sowohl Hefezellen als auch Hyphen ausbilden kann.

5.1.1. Die Deletion von *CaBNII* führt zu Defekten in der Morphologie, Zytokinese und der Aufrechterhaltung des filamentösen Wachstums

In *C. albicans* führte die Deletion der beiden Formingene zu morphologischen Defekten. Dabei führte der Verlust eines funktionellen *BNRI*-Gens lediglich zu elongierten Hefezellen, während weder bei der Zytokinese noch beim filamentösen Wachstum Defekte auftraten. Auch in *S. cerevisiae* führte die Deletion von *ScBNRI* nicht zu nennenswerten morphologischen Defekten (Imamura et al., 1997). Lediglich die Anzahl der Aktinkabel in der Mutterzelle war bei *Abnr1*-Stämmen geringer (Pruyne et al., 2004). Dieser Phänotyp wurde auch in der *Abnr1*-Mutante von *C. albicans* beobachtet. *A. gossypii* besitzt zwei *BNRI*-Homologe, wobei die Deletion beider Gene zu einem letalen Wachstumsdefekt führte (Schmitz et al., 2006). Ohne funktionelles Bni1 zeigte *C. albicans* massive Defekte während des Hefewachstums, die in einer rundlichen Morphologie und stark verbreiterten Knospungsnarben resultierte. Ähnliche Auswirkungen auf die Zytokinese wurden ebenfalls für *Ascbn1*-Mutanten in *S. cerevisiae* beobachtet (Vallen et al., 2000). Während des Hyphenwachstums waren *Abni1*-Mutanten von *C. albicans* zwar in der Lage, Keimschläuche auszubilden, die allerdings wesentlich breiter und kürzer waren als bei vergleichbaren Wildtypyphen. Das Hyphenwachstum konnte ohne funktionelles Bni1 nicht aufrechterhalten werden. Im Gegensatz zu seinen Homologen in *A. nidulans* und *A. gossypii* waren *C. albicans* *Abni1*-Mutanten lebensfähig (Harris et al., 1997, Schmitz et al., 2006). Allerdings führte eine Deletion der beiden *C. albicans* Formingene zu letalen Mutanten (Li et al., 2005).

Dieses Ergebnis wurde auch bei einer Doppeldeletion von *ScBNII* und *ScBNRI* in *S. cerevisiae* beobachtet (Kamei et al., 1998, Tong et al., 2001). Die Deletion von *CaBNII* führte nicht zu Defekten bei der Endozytose oder der Vakuolenmorphologie, wie diese beispielsweise nach der Deletion von *CaWALI* zu beobachten waren (Walther und Wendland, 2004a). Kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigten jedoch, dass Bni1 eine wichtige Rolle beim Transport von Golgivesikeln in die Hyphenspitze spielt (Rida et al., 2006). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Bni1 und damit auch Aktinpatches von Bedeutung bei der Exozytose sind, während Wall und die kortikalen Aktinpatches für die Endozytose eine zentrale Rolle besitzen.

5.1.2. Polarisom und Spitzenkörper

CaBni1 besitzt hypothetische Bindestellen für Spa2 und Bud6. Zusammen mit Bni1 weisen diese beiden Proteine das gleiche Lokalisierungsmuster an den Stellen polaren Wachstums und der Zytokinese auf (Zheng et al., 2003, Li et al., 2005, Crampin et al., 2005, diese Arbeit). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bni1 in Hyphenspitzen mit dem Spitzenkörper kolokalisiert. Auch für Bud6 und Spa2 konnte diese Beobachtung gemacht werden (Crampin et al., 2005). Das in dieser Arbeit verwendete Bni1-GFP-Konstrukt war zwar in der Lage zu lokalisieren, jedoch zeigte sich, dass es nicht in der Lage ist, die Funktion von Bni1 effektiv zu komplementieren. Wie auch schon von anderen Gruppen beschrieben, konnte keine Mutante erzeugt werden, in der ein *BNII*-Allel deletiert und das andere C-terminal mit GFP fusioniert werden konnte (Li et al., 2005). Da die mit Bni1-GFP erzielten Daten aber auch von anderen Gruppen bestätigt wurden, spiegeln sie die physiologische Situation korrekt wieder. Das *A. nidulans* Formin SepA zeigt eine größere Identität auf Aminosäurenebene zu CaBni1 als zu CaBnr1. In filamentösen Pilzen wurde für die bisher untersuchten Formine beobachtet, dass sie alle am Septum lokalisieren (Harris et al., 1997, Schmitz et al., 2006, Li et al., 2005), aber nur SepA und die Bni1-Homologen von *A. gossypii* und *C. albicans* auch in der Hyphenspitze vorzufinden waren (Sharpless und Harris, 2002, Li et al., 2005, Martin et al., 2005, Schmitz et al., 2006). Für CaBni1 und SepA wurde auch gezeigt, dass sie innerhalb der Hyphenspitze mit dem Spitzenkörper kolokalisieren (Harris et al., 2005, Martin et al., 2005). Ein Spitzenkörper wurde erstmals in *Polystictus versicolor* beschrieben (Girbardt, 1957). Später wurde diese Struktur als Vesikelverteilendes Zentrum in der Hyphenspitze definiert (Bartnicki-Garcia et al., 1995), wobei allerdings die genaue Zusammensetzung bisher unbekannt

ist. Die Tatsache, dass sowohl SepA als auch CaBni1 mit dem Spitzenkörper in den jeweiligen Organismen kolokalisieren, könnte dafür sprechen, dass Formine ein Teil dieser Struktur sind. Allerdings kann die überlagernde Lokalisierung auch dadurch zustande kommen, dass Formin und Spitzenkörper in der engen Hyphenspitze sehr eng beieinander liegen, aber nicht miteinander interagieren. Zumindest in *C. albicans* wurde jedoch gezeigt, dass die Deletionen von *CaBNI1*, *CaBUD6* und *CaSPA2* Auswirkungen auf die Morphologie des Spitzenkörpers haben (Crampin et al., 2005, Martin et al., 2005), so dass man vermuten kann, dass das Polarisom zumindest von Bedeutung bei der Ausbildung des Spitzenkörpers ist.

5.1.3. Ras1-induziertes Hyphenwachstum benötigt das Formin Bni1

Die *Abni1*-Mutante von *C. albicans* zeigt vielfältige Defekte während des polaren Hyphenwachstums. Dieses wird durch eine Signalkaskade reguliert, an deren Spitze die Ras1-GTPase steht. Es wurde untersucht, inwiefern eine Überexpression von *RAS1* das Fehlen eines funktionellen Bni1-Proteins ausgleichen kann. Mutanten mit dem konstitutiv aktiven *ras1*^{G13V}-Allel bilden unter allen Wachstumsbedingungen Hyphen aus (Feng et al., 1999). Während das in Stämmen mit funktionellen Bni1 zur Ausbildung von typischen langen und dünnen Hyphen führt, ist das in *bni1/bni1*-Stämmen nicht der Fall. Die Hyphen dieser Mutanten bleiben trotz der Überexpression von *RAS1* angeschwollen und kurz. Damit wurde gezeigt, dass das von Ras1-induzierte Hyphenwachstum von *C. albicans* das Formin Bni1 benötigt. Interessanterweise konnten auch die morphologischen Defekte einer *Δwall*-Mutante nicht durch die Überexpression von *RAS1* ausgeglichen werden (Martin et al., 2005). In den vergangenen Jahren wurde durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt, dass in *C. albicans* die Induktion von filamentösem Wachstum durch eine Signalkaskade reguliert wird, an deren Ende die Transkriptionsfaktoren Efg1 und Cph1 stehen (Leberer et al., 2001, Abbildung 39). Ras1 ist dabei die übergeordnete GTPase, welche zwar nicht überlebenswichtig ist, aber essentiell für die Ausbildung von Hyphen (Feng et al., 1999). Es wird vermutet, dass Ras1 in der Lage ist, Cdc42 über Cdc24 zu aktivieren (Leberer et al., 2001). In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Rho-GTPasen Cdc42 und Rho3 an die G-Proteinbindedomäne von ScBni1 binden und damit in der Lage sind, dieses zu aktivieren (Evangelista et al., 1997). Vor allem Rho3 ist in der Bäckerhefe von großer Bedeutung für die Funktion von ScBni1 (Dong et al., 2003). *C. albicans* enthält Homologe zu diesen beiden Rho-GTPasen. Für Cdc42 wurde nicht nur gezeigt, dass es

notwendig für das Überleben der Zellen, sondern auch, dass es sowohl an Septen als auch an Knospenspitzen und Hyphenspitzen lokalisiert (Ushinsky et al., 2002, Hazan und Liu, 2002). Diese Lokalisierungsmuster stimmt mit dem von CaBni1 überein (Li et al., 2005, Martin et al., 2005), so dass es möglich wäre, dass Cdc42 auch in *C. albicans* für die Aktivierung von Forminen von Bedeutung ist. Über diese Interaktion mit der Rho-GTPase läßt sich auch eine Verbindung mit Ras1 herstellen (Abbildung 39). Allerdings müssen in weiteren Experimenten noch die Interaktionen zwischen Bni1 und Cdc42 untersucht werden, zum Beispiel über 2-Hybrid-Systeme, Kolokalisierungsstudien und Analyse der Bni1-Dynamik in einer $\Delta cdc42$ -Mutante.

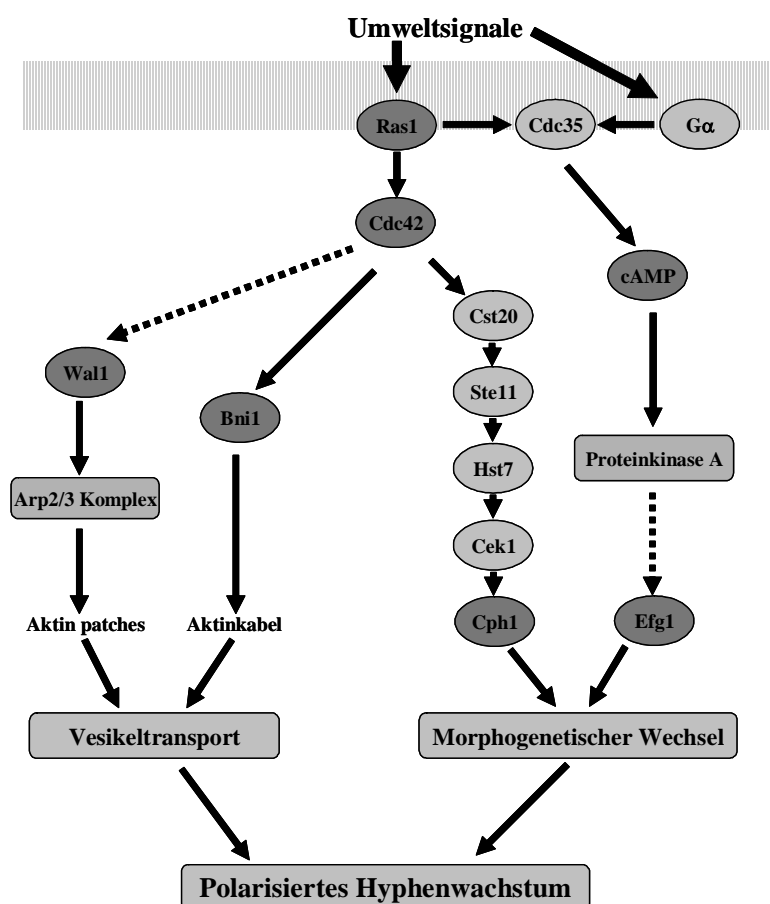


Abbildung 39. Die Ras1-Signalkaskade steuert das filamentöse Wachstum von *C. albicans*.

Das Modell ist eine modifizierte Version der Ras1-Signalkaskade, welche von Leberer et al. (2001) vorgeschlagen wurde. Ras1 steuert über die Cdc42 und die MAP-Kinase-Kaskade die Aktivität von Cph1 (Csank et al., 1998, Leberer et al., 1996, Köhler und Fink, 1996) und über den cAMP-Weg reguliert Ras1 den Transkriptionsfaktor Efg1 (Rocha et al., 2001, Sonneborn et al., 2000). Über Cdc42 und weitere Rho-GTPasen wird vermutet, dass Ras1 auch die Aktivität von Bni1 und Wal1 in *C. albicans* steuert (Martin et al., 2005).

Wie in Abbildung 39 gezeigt, ergeben die Untersuchungen zu den *C. albicans* Forminen die Hypothese, dass ihre Aktivität über Ras1 kontrolliert wird. Diese Steuerung wäre allerdings nur während des Hyphenwachstums notwendig, da eine $\Delta ras1$ -Mutante lebensfähig ist und nur keine Hyphen mehr ausbilden kann. Möglicherweise wird Ras1 dafür benötigt, Cdc42 und eventuell andere Rho-GTPasen an der Stelle des polarisierten Wachstums zu halten, damit sich das Polarisom und andere Strukturen wie der Spitzenkörper ausbilden und erhalten bleiben. Fehlt Ras1 bricht das polarisierte Wachstum nach Erreichen eines bestimmten Punktes zusammen und Cdc42, Bni1 und andere Komponenten lokalisieren ausschließlich am zytokinetischen Ring, um an der Zellteilung mitzuwirken. Dafür spricht, dass in Hefezellen kein Spitzenkörper beobachtet werden konnte (Crampin et al., 2005). Insofern wären weitere Untersuchungen von Interesse, um herauszufinden, wie die Etablierung des Spitzenkörpers in *C. albicans* reguliert wird.

5.2. Funktionsanalyse von *Candida albicans* Genen, deren *Saccharomyces cerevisiae* Homologe an der Endozytose und der Chitinsynthese beteiligt sind.

5.2.1. Untersuchungen zur Endozytose und der Vakuolenmorphologie

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass pilzliche WASP-Homologe in *S. cerevisiae*, *A. gossypii* und *C. albicans* von großer Bedeutung für die Endozytose und die Vakuolenmorphologie sind (Eitzen et al., 2002, Walther und Wendland 2004a, b). Deswegen wurden mit Hilfe PCR-basierender Verfahren verschiedene *C. albicans* Gene deletiert, deren Homologe in *S. cerevisiae* an der Endozytose und myosin-vermittelten Prozessen beteiligt sind. Die Deletion der Gene *CaABP1*, *CaBZZ1*, *CaEDE1* und *CaSMY1* führte in den betreffenden homozygoten Mutanten jedoch nicht zu morphologischen Defekten und es wurden auch keine Auswirkungen auf das filamentöse Wachstum beobachtet. Allerdings zeigten die $\Delta abp1$ -, $\Delta bzz1$ - und $\Delta smy1$ -Mutanten leichte Defekte bei der Vakuolenfusion, was dazu führte, dass in den Mutterzellen nicht wie beim Wildtyp nur eine große sondern oft mehrere kleine Vakuolen zu beobachten waren. Dieser Phänotyp war im Vergleich zu $\Delta wall$ -Mutanten nicht so stark ausgeprägt. Ohne Wall war vor allem die Anzahl kleiner Vakuolen sehr hoch (Walther und Wendland, 2004a). Die Hefehomologe von Abp1 und Bzz1 sind unmittelbar an Prozessen beteiligt, an denen auch das WASP-Homolog teilnimmt.

ScAbp1 ist ebenfalls ein Arp2/3-Aktivator und beteiligt an den späten Phasen der Endozytose und des Vesikeltransports. Insofern kann es nicht überraschen, dass die Deletion von *ABP1* zu leichten Defekten bei der Vakuolenmorphologie führt. Andererseits ist Abp1 in *C. albicans* nicht so wichtig, da die Mutante keine nennenswerten morphologischen Veränderungen aufweist. Offensichtlich sind das WASP-Homolog Wal1 und Pan1 die wichtigeren Arp2/3-Aktivatoren. In *S. cerevisiae* bindet das Bzz1-Homolog an Las17/Bee1. Ob diese Interaktion auch in *C. albicans* zwischen CaBzz1 und Wal1 stattfindet muss noch untersucht werden. Da die Deletion von *BZZ1* alleine lediglich zu leichten Veränderungen in der Vakuolenmorphologie führt, könnte eine Doppeldeletion von *WAL1* und *BZZ1* vielleicht mehr Aussagen erlauben. Auch eine Doppelmutante $\Delta wal1 \Delta abp1$ könnte zeigen, ob Abp1 in Abwesenheit von Wal1 eine größere Rolle bei der Endozytose einnimmt. Interessanterweise weist eine *C. albicans* $\Delta smy1$ -Mutante leichte Defekte bei der Vakuolenmorphologie aus. In *S. cerevisiae* wurde Smy1 als Suppressor von Myo2 identifiziert (Lillie und Brown, 1992). In Untersuchungen über die Vakuolenmorphologie in Hefemutanten wurde nicht berichtet, dass die Deletion von *ScSMY1* Auswirkungen auf die Fusion oder Größe von Vakuolen hat (Eitzen et al., 2002). Auch in *A. gossypii* wurden bei der Deletion des *AgSMY1*-Gens keine Defekte in der Vakuolenmorphologie festgestellt (Hebecker und Wendland, unveröffentlicht).

5.2.2. Pan1 ist essentiell für die Endozytose in *C. albicans*

Endozytose ist ein Prozess, welcher für die Aufnahme von Substanzen für alle Lebewesen von großer Bedeutung ist. In *S. cerevisiae* wurden die Mechanismen dieses Vorganges in den vergangenen Jahren sehr genau analysiert. Dabei wurde vor allem festgestellt, dass kortikale Aktinpatches und deren Nukleator, der Arp2/3-Komplex, sowie die Arp2/3-Aktivatoren Pan1, Las17/WASP und Abp1 entscheidend für die Ausbildung von endozytischen Vesikeln sind (Kaksonen et al., 2003). Dabei wurde gezeigt, dass Pan1 im Verbund mit dem Sla1-Komplex an der frühen Phase der Endozytose beteiligt ist und zumindest in *S. cerevisiae* überlebenswichtig ist (Tang et al., 2000). In *C. albicans* war die Herstellung einer homozygoten $\Delta pan1$ -Mutante nicht möglich, so dass im Hintergrund einer *PAN1/pan1*-Heterozygoten das verbliebene Allel unter die Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors gestellt wurde. Dabei zeigten sich nach Abschalten des *MET3p-PAN1*-Allels große morphologische Veränderungen.

Die betroffenen Zellen schwellen an und konnten sich auch nicht mehr trennen. Das Hyphenwachstum war durch die Abschaltung des *MET3*-Promotors und des damit verbundenen Verlustes eines funktionellen *PAN1*-Gens stark betroffen. Die Zellen waren nicht in der Lage, Keimschläuche oder gar Hyphen auszubilden. In Medien mit jeweils 2,5mM Methionin und Cystein war das *MET3p-PAN1*-Allel nicht aktiv und damit einhergehend war ein sehr schlechtes Wachstum zu beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne aktives *PAN1*-Gen nicht in der Lage waren den Vakuolenfarbstoff FM4-64 aufzunehmen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Pan1 für die Endozytose in *C. albicans* von essentieller Bedeutung ist und damit eine ähnliche zentrale Rolle spielt wie sein Homolog in *S. cerevisiae* (Wendland et al., 1996). Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, dass Endozytose von großer Bedeutung für das Hyphenwachstum ist, unterstützt durch die Tatsache, dass auch eine Δ *wal1*-Mutante keine Hyphen ausbilden kann (Walther und Wendland, 2004a). Während lange umstritten war, ob filamentöse Pilze überhaupt Endozytose durchführen (Read und Kalkman, 2003), haben vergangene Arbeiten im filamentösen Ascomyceten *A. gossypii* und dem dimorphen Basidiomyceten *Ustilago maydis* gezeigt, dass auch in diesen Organismen Endozytose durchgeführt wird (Walther und Wendland, 2004b, Fuchs und Steinberg, 2005). Endozytose ist in *U. maydis* ebenfalls von zentraler Bedeutung für die Pathogenität, zum Beispiel durch Pheromonwahrnehmung (Fuchs et al., 2006). In *Neurospora crassa* gibt es Hinweise, dass Endozytose in den Hyphen dieses Pilzes nicht stattfindet (Torralba und Heath, 2002), obwohl die Aufnahme von FM4-64 schon früher für Pilze wie *N. crassa*, *A. nidulans* und *Magnaporthe grisea* beobachtet wurde (Fischer-Parton et al., 2000). Allerdings ist *C. albicans* neben *S. cerevisiae* erst der zweite Pilz in dem gezeigt wurde, dass ein Pan1-Homolog essentiell für die Endozytose ist. Da von den beiden anderen Arp2/3-Aktivatoren Wal1 ebenfalls Endozytosedefekte zeigt und Δ *abp1*-Mutanten zumindest Schwierigkeiten bei der Vakuolenfusion aufweisen (Walther und Wendland, 2004a, diese Arbeit), kann davon ausgegangen werden, dass sich die Endozytosemechanismen von *C. albicans* und *S. cerevisiae* sehr ähnlich sind. In weiteren Arbeiten sollte jedoch genauer untersucht werden, welche Rolle Pan1 bei der Ausbildung der kortikalen Aktinpatches spielt und wie die Interaktionen mit anderen Proteinen, zum Beispiel den *C. albicans* Homologen für Sla1, Sla2 und End3 aussehen. Damit könnten genauere Einblicke in die frühen Phasen der Endozytose von *C. albicans* gewonnen werden.

5.3. Expression der *CTA2*-Gene in *Candida albicans*

5.3.1. Die *C. albicans* *CTA2*-Genfamilie

In vorangegangenen Arbeiten wurde untersucht, welche *C. albicans* Gene unter hypheninduzierenden Bedingungen eine verstärkte Expression aufweisen. Unter anderem wurden dabei ORFs identifiziert, welche zur *CTA2*-Familie gehören (Nantel et al., 2002). Der Name *CTA* steht für Candida Transkriptionsaktivator. Name und Funktion wurden für den ORF 19.6112 geprägt, welcher in einem Hefe-1-Hybrid-System transkriptionsaktivierende Funktionen zeigte (Kaiser et al., 1999). Untersucht man das annotierte Genom von *C. albicans* (Braun et al., 2005) genauer, kann man mindestens 14 offene Leserahmen identifizieren, die sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene sehr konserviert sind. Diese repetitiven ORFs liegen fast alle in der Nähe der Telomere und jedes *C. albicans* Chromosom an mindestens einem Telomer ein solches *CTA2*-Gen. Auch in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurden telomernahe repetitive Gene beschrieben (Pryde und Louis, 1997). Die Cta2-Proteine von *C. albicans* zeichnen sich durch eine identische Startsequenz (MPEN) und die Existenz von EK-Motiven aus. Diese EK-Motive sind reich an Lysin und Glutamat und determinieren durch ihre Anzahl wesentlich die Größe der Proteine. Es gibt zwei Unterfamilien von Cta2, wobei die acht Mitglieder der A-Unterfamilie sich durch identische Start- und Schlusssequenzen auszeichnen. Die Proteine der B-Unterfamilie sind kleiner und unterscheiden sich vor allem am C-terminalen Ende von den Cta2-A-Proteinen. Interessanterweise gibt es zu den *CTA2*-Genen keine Homologen in *S. cerevisiae*, so dass es möglich ist, dass diese eine spezifische Funktion für *C. albicans* ausführen. Lediglich in *C. dubliniensis* wurden Homologe zu *CTA2* gefunden (Moran et al., 2004), deren Funktion jedoch weitestgehend unbekannt ist. Das ist auch für die *CTA2*-Gene in *C. albicans* der Fall.

5.3.2. Steigerung der Expression von *CTA2*-Genen unter während des Hyphenwachstums

Für die Untersuchung der Expression von *CTA2*-Genen wurden die Promotoren der beiden Gene 2661_*CTA2* und 6191_*CTA2* mit dem *Streptococcus thermophilus lacZ*-Gen und ortsspezifisch vor den jeweiligen ORF integriert. Die so hergestellten Stämme zeigten sowohl während des Hefe- als auch während des filamentösen Wachstums eine Expression von *lacZ*. Dabei wurde das Gen für die β -Galactosidase in Hyphen jedoch

wesentlich stärker exprimiert. Interessanterweise lag das Expressionslevel der *2661_CTA2p-lacZ*-Stämme höher als das der *6191_CTA2p-lacZ*-Mutanten. Möglicherweise ist der Lage der beiden ORFs eine Begründung für die Expressionsunterschiede. Während *6191_CTA2* am Telomer von Chromosom 3 liegt, ist *2661_CTA2* für die mittleren Regionen von Chromosom 1 annotiert worden. Allerdings ist der Bereich, in welchem dieser ORF liegt nicht wirklich gut annotiert worden, so dass es auch möglich ist, dass *2661_CTA2* doch eine andere Lage hat. Die Ergebnisse der *lacZ*-Versuche wurden in-vivo mit dem CaVENUS-YFP überprüft. Dafür wurden die *CTA2*-Promotoren mit dem *YFP*-Gen fusioniert und wieder ortsspezifisch integriert. Dabei wurde ebenfalls die Expressionssteigerung während des filamentösen Wachstums festgestellt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass diese Steigerung mit Serum als Hypeninduktor stärker ist als auf dem natürlichen Darmepithelgewebe von Schweinen. Die Steigerungsraten mit Serum lagen beim Faktor 2, was in etwa den Ergebnissen der DNA-Microarray-Versuche entsprach (Nantel et al., 2002). Auch in *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass telomernahe Gene unter bestimmten Bedingungen ihre Expression um das bis zu neunfache steigern können (Barton und Kaback, 2006). Die Expression der *CTA2p-lacZ*- oder *CTA2p-YFP*-Fusionen könnte in Zukunft auch in verschiedenen Mutanten von *C. albicans* untersucht werden, welchen beispielsweise bestimmte Transkriptionsfaktoren wie Efg1, Cph1, Tup1 oder Nrg1 fehlen. Erste Untersuchungen zeigten, dass in einer $\Delta cph1 \Delta efg1$ -Doppelmutante die Expression der *CTA2p-lacZ*-Konstrukte ausgeschaltet wurde (Schaub und Wendland, unveröffentlicht).

5.3.3. Ausschaltung der *CTA2*-Expression

In isogenen Kulturen von Mikroorganismen unterscheidet sich in der Regel ein bestimmter Prozentsatz der Zellen durch die Ausschaltung bestimmter Gene oder durch abweichende physiologische Merkmale. Normalerweise treten diese Zellen nicht in Erscheinung, allerdings können sie bei Änderung der Umweltbedingungen zum Überleben beitragen (Überblick von Avery, 2006). Die Zugabe von 5-Fluorotischer Säure (5-FOA) beispielsweise tötet in einer Kultur alle Zellen ab, die das *URA3*-Gen exprimieren. Dadurch können jedoch solche Zellen überleben, die aus verschiedenen Gründen dieses Gen nicht aktiviert haben. In *C. albicans* wurde dieses Verfahren für die URA-Blaster-Strategie verwandt (Fonzi und Irwin, 1993). Bei der Untersuchung der Funktion der *S. cerevisiae* Gene *FLO10* und *FLO11* wurden die Promotoren der beiden Gene mit dem *ScURA3*-Gen fusioniert, so dass in Anwesenheit von 5-FOA die Zellen

isoliert werden konnten, in welchen die *FLO*-Promotoren nicht aktiv waren, was der Beweis für die telomerassoziierte Genausschaltung von *FLO10* und *FLO11* war (Halme et al., 2004). Wie diese *FLO*-Gene so liegen auch die *CTA2*-ORFs in der Nähe der Telomere. Deswegen wurden Stämme hergestellt, in denen sich das *CaURA3*-Gen unter der Kontrolle der *2661_CTA2*- und *6191_CTA2*-Promotoren befand. Diese Mutanten zeigten auch bei der Anwesenheit von 5-FOA im Medium Wachstum. Damit konnte gezeigt werden, dass auch diese beiden *CTA2*-Gene stillgelegt werden. Diese Beobachtung konnte sowohl in der Hefe- als auch in der Hyphenphase gemacht werden. Die Genausschaltung war reversibel, wobei die Zeitspanne von der Stilllegung bis zur erneuten Aktivität von *CTA2p-CaURA3* mindestens 20 Generationen betrug. Dieser Zeitabstand war für *6191_CTA2* größer als für *2661_CTA2*. Auch für die *FLO*-Gene von *S. cerevisiae* konnte die Reversion der Ausschaltung gezeigt werden (Halme et al., 2004). Für *FLO10* und *FLO11* wurde gezeigt, dass Histondeacetylasen unmittelbar an der Stilllegung der Gene beteiligt sind, unter anderem ScHda1 (Halme et al., 2004). In *C. albicans* war für *2661_CTA2* und *6191_CTA2* zu beobachten, dass die Deletion des *CaHDA1*-Gens keine Auswirkungen auf die Genausschaltung hatte und auch die Zugabe von Trichostatin A, einer Substanz die für einige Histondeacetylasen inhibierend wirkt, konnte die Stilllegung der beiden *CTA2*-Promotoren nicht verhindern. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht alle potentiellen Histondeacetylasen, die im *C. albicans* Genom kodiert sind, getestet werden. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Genstilllegung übergeordnet von Sir2 und Sir3 reguliert wird (Halme et al., 2004). Das *C. albicans* Homolog Sir2 spielt eine zentrale Rolle bei der Stabilität der Chromosomen und dem Wechsel zwischen white und opaque- Zellen (Perez-Martin et al., 1999), so dass weiterführende Untersuchungen das Ausschaltung der *CTA2*-Promotoren in Δ *sir2*-Stämmen analysieren sollten. Neben der Regulation durch Histondeacetylasen spielt auch die Entfernung des Promotors vom Telomer eine Rolle für die telomerassoziierte Genstilllegung. Dieser sogenannte Telomerpositionseffekt wurde in *S. cerevisiae* für telomernahe Gene beschrieben (Gottschling et al., 1990, Pirrotta und Gross, 2005). Für *ScIMD1* konnte gezeigt werden, dass eine künstliche Entfernung des ORFs durch die Integration zusätzlicher DNA die Genstilllegung verhinderte (Barton und Kaback, 2006). Auch für *FLO11* wurde ein Telomerpositionseffekt beobachtet (Halme et al., 2004). In *C. albicans* konnten für *6191_CTA2p-lacZ-CaURA3*- und *6191_CTA2p-CaURA3*-Stämme deutliche Wachstumsunterschiede beobachtet werden. Dabei war die Überlebensrate der *6191_CTA2p-CaURA3*-Zellen auf

5-FOA-haltigen Medien mit 86% sehr viel höher als bei Zellen mit den mit den *lacZ*-*CaURA3*-Konstrukten, bei denen lediglich 1% der eingesetzten Zellen durch Genausschaltung auf 5-FOA-Medien überleben konnten. Dieser Effekt war durch die Entfernung zwischen *CTA2*-Promotor und *CaURA3* zu erklären. Bei den *CTA2p-lacZ*-*CaURA3*-Fusionen lag zwischen *CTA2*-Promotor und *CaURA3* noch das über 3kb große *lacZ*-Gen, außerdem verfügte *CaURA3* über seinen endogenen Promotor. Durch die zusätzliche Integration eines weiteren *lacZ*-Plasmids mit dem *ScLEU2*-Marker wurde die Entfernung zwischen *6191_CTA2*-Promotor und *CaURA3* auf über 9kb vergrößert, was das Wachstum auf 5-FOA-Medien weiter verschlechterte, aber noch nicht komplett unterbinden konnte. Trotzdem deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass auch in *C. albicans* Positionseffekte die Expression telomernaher Gene beeinflussen. Um mögliche biologische Auswirkungen von telomerassoziierten Genausschaltungen zu studieren würden sich Gene anbieten, deren Deletion morphologische Defekte hervorrufen würde. Die *C. albicans* *NAG*-Gene, deren Produkte im N-Acetylglucosamin-Stoffwechsel wichtige Funktionen ausüben, liegen in der Nähe des Telomers von Chromosom 6.

5.3.4. 2661_CTA2 kodiert für einen Transkriptionsaktivator

Frühere Ergebnisse in einem *S. cerevisiae*-1-Hybrid-System identifizierten den ORF 19.6112, welcher für ein Cta2-Protein der Unterfamilie A kodiert, als Transkriptionsaktivator (Kaiser et al., 1999, T. Munder, persönliche Kommunikation). Innerhalb der letzten Jahre wurde allerdings ein 1-Hybrid-Testsystem für *C. albicans* entwickelt (Russell und Brown, 2005). Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt, um zu testen, ob die beiden ORFs 19.2661 und 19.6191 für Transkriptionsfaktoren kodieren. Dabei wurde beobachtet, dass sich *2661_CTA2* genauso verhielt wie *GCN4*, welches für einen Transkriptionsaktivator in *C. albicans* kodiert (Russell und Brown, 2005, Tripathi et al., 2002). Interessanterweise zeigte *6191_CTA2* unter den gleichen Bedingungen keine aktivierende Funktion. Der Nachweis von *2661_Cta2* als Transkriptionsaktivator bestätigt die früheren Ergebnisse mit dem *6112_CTA2*-Gen. Da beide zur Unterfamilie A gehören, könnte man schlussfolgern, dass diese Cta2-A-Proteine in den *C. albicans* Zellen als Transkriptionsfaktoren dienen. Für genauere Aussagen müssten aber noch weitere Mitglieder dieser Unterfamilie untersucht auf ihren Einfluss auf die Transkription untersucht werden. Als potentielle Aktivatoren sollten sie jedoch zumindest teilweise im

Zellkern lokalisieren. Innerhalb dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, eines der Cta2-Proteine mit GFP zu markieren. Diese Probleme können jedoch auch an Schwierigkeiten mit der C-terminalen GFP-Fusion liegen. Weitere Arbeiten sollten ebenfalls untersuchen, ob es auch innerhalb der *CTA2*-Unterfamilie B Transkriptionsaktivatoren oder –repressoren gibt. Desweiteren müsste untersucht werden, ob die für *266I_CTA2* gezeigte Aktivierung direkt oder indirekt ist. Zur Identifizierung von Cta2-bindenden Proteinen würde sich ein Hefe-2-Hybrid-Versuch oder Co-Immunoprecipitation anbieten.

6. Literatur

6. Literatur

6.1. Fachliteratur

- Adams, A.E., D.I. Johnson, R.M. Longnecker, B.F. Sloat, and J.R. Pringle. 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 111:131-42.
- Adams, A.E., and J.R. Pringle. 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 98:934-45.
- Alberts, A.S. 2001. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem.* 276:2824-30.
- Alberts, A.S., N. Bouquin, L.H. Johnston, and R. Treisman. 1998. Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem.* 273:8616-22.
- Avery, S.V. 2006. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nat Rev Microbiol.* 4:577-87.
- Bartnicki-Garcia, S., D.D. Bartnicki, G. Gierz, R. Lopez-Franco, and C.E. Bracker. 1995. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol.* 19:153-9.
- Barton, A.B., and D.B. Kaback. 2006. Telomeric Silencing of an Open Reading Frame in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 173:1169-73.
- Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R.D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E.L. Sonnhammer, D.J. Studholme, C. Yeats, and S.R. Eddy. 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 32:D138-41.
- Brakhage, A.A. 1998. Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:547-85.
- Braun, B.R., M. van Het Hoog, C. d'Enfert, M. Martchenko, J. Dungan, A. Kuo, D.O. Inglis, M.A. Uhl, H. Hogues, M. Berriman, M. Lorenz, A. Levitin, U. Oberholzer, C. Bachewich, D. H Marcus, A. Marcil, D. Dignard, T. Iouk, R. Zito, L. Frangeul, F. Tekaiia, K. Rutherford, E. Wang, C.A. Munro, S. Bates, N.A. Gow, L.L. Hoyer, G. Kohler, J. Morschhauser, G. Newport, S. Znaidi, M. Raymond, B. Turcotte, G. Sherlock, M. Costanzo, J. Ihmels, J. Berman, D. Sanglard, N. Agabian, A.P. Mitchell, A.D. Johnson, M. Whiteway, and A. Nantel. 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* 1:36-57.
- Calvin, N.M., and P.C. Hanawalt. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* 170:2796-801.
- Castrillon, D.H., and S.A. Wasserman. 1994. Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development.* 120:3367-77.
- Crampin, H., K. Finley, M. Gerami-Nejad, H. Court, C. Gale, J. Berman, and P. Sudbery. 2005. *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J Cell Sci.* 118:2935-47.
- Csank, C., K. Schroppel, E. Leberer, D. H Marcus, O. Mohamed, S. Meloche, D.Y. Thomas, and M. Whiteway. 1998. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun.* 66:2713-21.
- Dong, Y., D. Pruyne, and A. Bretscher. 2003. Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol.* 161:1081-92.
- Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-45.
- Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G.C. Chen, R.A. Ford, C.S. Chan, Y. Takai, and E. Cabib. 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science.* 272:277-9.
- Drubin, D.G., J. Mulholland, Z.M. Zhu, and D. Botstein. 1990. Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature.* 343:288-90.
- Drubin, D.G., and W.J. Nelson. 1996. Origins of cell polarity. *Cell.* 84:335-44.
- Duncan, M.C., M.J. Cope, B.L. Goode, B. Wendland, and D.G. Drubin. 2001. Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.* 3:687-90.

- Eitzen, G., L. Wang, N. Thorngren, and W. Wickner. 2002. Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J Cell Biol.* 158:669-79.
- Evangelista, M., K. Blundell, M.S. Longtine, C.J. Chow, N. Adames, J.R. Pringle, M. Peter, and C. Boone. 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science.* 276:118-22.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone, and A. Bretscher. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol.* 4:260-9.
- Feng, Q., E. Summers, B. Guo, and G. Fink. 1999. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 181:6339-46.
- Fischer-Parton, S., R.M. Parton, P.C. Hickey, J. Dijksterhuis, H.A. Atkinson, and N.D. Read. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc.* 198:246-59.
- Fonzi, W.A., and M.Y. Irwin. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics.* 134:717-28.
- Fuchs, U., G. Hause, I. Schuchardt, and G. Steinberg. 2006. Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell.* 18:2066-81.
- Fuchs, U., and G. Steinberg. 2005. Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Protoplasma.* 226:75-80.
- Gagiano, M., D. Van Dyk, F.F. Bauer, M.G. Lambrechts, and I.S. Pretorius. 1999. Divergent regulation of the evolutionarily closely related promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* STA2 and MUC1 genes. *J Bacteriol.* 181:6497-508.
- Gagny, B., A. Wiederkehr, P. Dumoulin, B. Winsor, H. Riezman, and R. Haguenaue-Tsapis. 2000. A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J Cell Sci.* 113 (Pt 18):3309-19.
- Gale, C.A., C.M. Bendel, M. McClellan, M. Hauser, J.M. Becker, J. Berman, and M.K. Hostetter. 1998. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science.* 279:1355-8.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems, and R.A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast.* 11:355-60.
- Gillum, A.M., E.Y. Tsay, and D.R. Kirsch. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol Gen Genet.* 198:179-82.
- Girbardt, M. 1957. Der Spitzenkörper von *Polysticus versicolor*. *Planta.* 50: 47-59.
- Gola, S., R. Martin, A. Walther, A. Dunkler, and J. Wendland. 2003. New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast.* 20:1339-47.
- Goode, B.L., A.A. Rodal, G. Barnes, and D.G. Drubin. 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol.* 153:627-34.
- Gottschling, D.E., O.M. Aparicio, B.L. Billington, and V.A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell.* 63:751-62.
- Gow, N.A., A.J. Brown, and F.C. Odds. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* 5:366-71.
- Halme, A., S. Bumgarner, C. Styles, and G.R. Fink. 2004. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell.* 116:405-15.
- Harris, S.D., L. Hamer, K.E. Sharpless, and J.E. Hamer. 1997. The *Aspergillus nidulans* sepA gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *Embo J.* 16:3474-83.
- Harris, S.D., N.D. Read, R.W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann, and M. Momany. 2005. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell.* 4:225-9.
- Hazan, I., M. Sepulveda-Becerra, and H. Liu. 2002. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 13:134-45.
- Heath, I.B., and G. Steinberg. 1999. Mechanisms of hyphal tip growth: tube dwelling amebae revisited. *Fungal Genet Biol.* 28:79-93.
- Hoffman, C.S., and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57:267-72.
- Hube, B., and J. Naglik. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147:1997-2005.
- Hull, C.M., and A.D. Johnson. 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science.* 285:1271-5.

- Hull, C.M., R.M. Raisner, and A.D. Johnson. 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*. 289:307-10.
- Imamura, H., K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, T. Kamei, K. Takahashi, T. Sasaki, and Y. Takai. 1997. Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*. 16:2745-55.
- Ish-Horowicz, D., and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res*. 9:2989-98.
- Jones, T., N.A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B.B. Magee, G. Newport, Y.R. Thorstenson, N. Agabian, P.T. Magee, R.W. Davis, and S. Scherer. 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:7329-34.
- Kaiser, B., T. Munder, H.P. Saluz, W. Kunkel, and R. Eck. 1999. Identification of a gene encoding the pyruvate decarboxylase gene regulator CaPdc2p from *Candida albicans*. *Yeast*. 15:585-91.
- Kaksonen, M., Y. Sun, and D.G. Drubin. 2003. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*. 115:475-87.
- Kamei, T., K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, H. Imamura, M. Kikyo, K. Ozaki, and Y. Takai. 1998. Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 273:28341-5.
- Kaneko, A., T. Umeiyama, N. Hanaoka, B.C. Monk, Y. Uehara, and M. Niimi. 2004. Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast*. 21:1025-33.
- Köhler, G.A., T.C. White, and N. Agabian. 1997. Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol*. 179:2331-8.
- Köhler, J.R., and G.R. Fink. 1996. *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13223-8.
- Kohno, H., K. Tanaka, A. Mino, M. Umikawa, H. Imamura, T. Fujiwara, Y. Fujita, K. Hotta, H. Qadota, T. Watanabe, Y. Ohya, and Y. Takai. 1996. Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*. 15:6060-8.
- Leberer, E., D. H Marcus, D. Dignard, L. Johnson, S. Ushinsky, D.Y. Thomas, and K. Schroppel. 2001. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 42:673-87.
- Lechler, T., G.A. Jonsdottir, S.K. Klee, D. Pellman, and R. Li. 2001. A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast. *J Cell Biol*. 155:261-70.
- Lechler, T., and R. Li. 1997. In vitro reconstitution of cortical actin assembly sites in budding yeast. *J Cell Biol*. 138:95-103.
- Lew, D.J., and S.I. Reed. 1995a. A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J Cell Biol*. 129:739-49.
- Lew, D.J., and S.I. Reed. 1995b. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev*. 5:17-23.
- Li, C.R., Y.M. Wang, X. De Zheng, H.Y. Liang, J.C. Tang, and Y. Wang. 2005. The formin family protein CaBni1p has a role in cell polarity control during both yeast and hyphal growth in *Candida albicans*. *J Cell Sci*. 118:2637-48.
- Li, R. 1997. Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 136:649-58.
- Lillie, S.H., and S.S. Brown. 1992. Suppression of a myosin defect by a kinesin-related gene. *Nature*. 356:358-61.
- Liu, H., J. Kohler, and G.R. Fink. 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science*. 266:1723-6.
- Lo, H.J., J.R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G.R. Fink. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 90:939-49.
- Lo, W.S., and A.M. Dranginis. 1996. FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol*. 178:7144-51.
- Lo, W.S., and A.M. Dranginis. 1998. The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 9:161-71.
- Lockhart, S.R., K.J. Daniels, R. Zhao, D. Wessels, and D.R. Soll. 2003. Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2:49-61.
- Magee, B.B., and P.T. Magee. 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science*. 289:310-3.

- Moran, G., C. Stokes, S. Thewes, B. Hube, D.C. Coleman, and D. Sullivan. 2004. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology*. 150:3363-82.
- Moseley, J.B., and B.L. Goode. 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70: 605-645.
- Moseley, J.B., and B.L. Goode. 2005. Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem*. 280:28023-33.
- Moseley, J.B., I. Sagot, A.L. Manning, Y. Xu, M.J. Eck, D. Pellman, and B.L. Goode. 2004. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*. 15:896-907.
- Nantel, A., D. Dignard, C. Bachewich, D. Marcus, A. Marcil, A.P. Bouin, C.W. Sensen, H. Hogues, M. van het Hoog, P. Gordon, T. Rigby, F. Benoit, D.C. Tessier, D.Y. Thomas, and M. Whiteway. 2002. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell*. 13:3452-65.
- Naqvi, S.N., R. Zahn, D.A. Mitchell, B.J. Stevenson, and A.L. Munn. 1998. The WASp homologue Las17p functions with the WIP homologue End5p/verprolin and is essential for endocytosis in yeast. *Curr Biol*. 8:959-62.
- Noble, S.M., and A.D. Johnson. 2005. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 4:298-309.
- Oberholzer, U., A. Marcil, E. Leberer, D.Y. Thomas, and M. Whiteway. 2002. Myosin I is required for hypha formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 1:213-28.
- Perez-Martin, J., J.A. Uria, and A.D. Johnson. 1999. Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a SIR2 gene. *Embo J*. 18:2580-92.
- Petersen, J., O. Nielsen, R. Egel, and I.M. Hagan. 1998. FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J Cell Biol*. 141:1217-28.
- Pirrotta, V., and D.S. Gross. 2005. Epigenetic silencing mechanisms in budding yeast and fruit fly: different paths, same destinations. *Mol Cell*. 18:395-8.
- Pring, M., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, and S.H. Zigmond. 2003. Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry*. 42:486-96.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*. 297:612-5.
- Pruyne, D., L. Gao, E. Bi, and A. Bretscher. 2004. Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell*. 15:4971-89.
- Pryde, F.E., and E.J. Louis. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 62:1232-41.
- Pujol, C., K.J. Daniels, S.R. Lockhart, T. Srikantha, J.B. Radke, J. Geiger, and D.R. Soll. 2004. The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate. *Eukaryot Cell*. 3:1015-27.
- Read, N.D., and E.R. Kalkman. 2003. Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol*. 39:199-203.
- Reynolds, T.B., and G.R. Fink. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*. 291:878-81.
- Rida, P.C., A. Nishikawa, G.Y. Won, and N. Dean. 2006. Yeast to Hyphal Transition Triggers Formin-dependent Golgi Localization to the Growing Tip in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 17:1030-2.
- Rocha, C.R., K. Schroppel, D. Marcus, A. Marcil, D. Dignard, B.N. Taylor, D.Y. Thomas, M. Whiteway, and E. Leberer. 2001. Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 12:3631-43.
- Russell, C.L., and A.J. Brown. 2005. Expression of one-hybrid fusions with *Staphylococcus aureus* lexA in *Candida albicans* confirms that Nrg1 is a transcriptional repressor and that Gcn4 is a transcriptional activator. *Fungal Genet Biol*. 42:676-83.
- Sagot, I., S.K. Klee, and D. Pellman. 2002a. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol*. 4:42-50.
- Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, and D. Pellman. 2002b. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*. 4:626-31.
- Santos, M.A., and M.F. Tuite. 1995. The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*. 23:1481-6.

- Schaub, Y., A. Dunkler, A. Walther, and J. Wendland. 2006. New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*. *J Basic Microbiol.* 46:416-29.
- Schmitz, H.P., A. Kaufmann, M. Kohli, P.P. Laissue, and P. Philippsen. 2006. From function to shape: a novel role of a formin in morphogenesis of the fungus *Ashbya gossypii*. *Mol Biol Cell.* 17:130-45.
- Sharpless, K.E., and S.D. Harris. 2002. Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell.* 13:469-79.
- Sheu, Y.J., Y. Barral, and M. Snyder. 2000. Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 20:5235-47.
- Sheu, Y.J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan, and M. Snyder. 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 18:4053-69.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.
- Sonneborn, A., D.P. Bockmuhl, M. Gerads, K. Kurpanek, D. Sanglard, and J.F. Ernst. 2000. Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 35:386-96.
- Soulard, A., S. Friant, C. Fitterer, C. Orange, G. Kaneva, G. Mirey, and B. Winsor. 2005. The WASP/Las17p-interacting protein Bzz1p functions with Myo5p in an early stage of endocytosis. *Protoplasma.* 226:89-101.
- Soulard, A., T. Lechler, V. Spiridonov, A. Shevchenko, A. Shevchenko, R. Li, and B. Winsor. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery in vitro. *Mol Cell Biol.* 22:7889-906.
- Tang, H.Y., and M. Cai. 1996. The EH-domain-containing protein Pan1 is required for normal organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 16:4897-914.
- Tang, H.Y., A. Munn, and M. Cai. 1997. EH domain proteins Pan1p and End3p are components of a complex that plays a dual role in organization of the cortical actin cytoskeleton and endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 17:4294-304.
- Tang, H.Y., J. Xu, and M. Cai. 2000. Pan1p, End3p, and Sla1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 20:12-25.
- Tong, A.H., M. Evangelista, A.B. Parsons, H. Xu, G.D. Bader, N. Page, M. Robinson, S. Raghibizadeh, C.W. Hogue, H. Bussey, B. Andrews, M. Tyers, and C. Boone. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science.* 294:2364-8.
- Torralba, S., and I.B. Heath. 2002. Analysis of three separate probes suggests the absence of endocytosis in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genet Biol.* 37:221-32.
- Tripathi, G., C. Wiltshire, S. Macaskill, H. Tournu, S. Budge, and A.J. Brown. 2002. Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *Embo J.* 21:5448-56.
- Uhl, M.A., and A.D. Johnson. 2001. Development of *Streptococcus thermophilus* lacZ as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology.* 147:1189-95.
- Ushinsky, S.C., D. H Marcus, J. Ash, D. Dignard, A. Marcil, J. Morchhauser, D.Y. Thomas, M. Whiteway, and E. Leberer. 2002. CDC42 is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 1:95-104.
- Vallen, E.A., J. Caviston, and E. Bi. 2000. Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and myo1p in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 11:593-611.
- Vega-Palas, M.A., E. Martin-Figueroa, and F.J. Florencio. 2000. Telomeric silencing of a natural subtelomeric gene. *Mol Gen Genet.* 263:287-91.
- Virag, A., and S.D. Harris. 2006. Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. *Eukaryot Cell.* 5:881-95.
- Walther, A., and J. Wendland. 2003. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet.* 42:339-43.
- Walther, A., and J. Wendland. 2004a. Apical localization of actin patches and vacuolar dynamics in *Ashbya gossypii* depend on the WASP homolog Wal1p. *J Cell Sci.* 117:4947-58.
- Walther, A., and J. Wendland. 2004b. Polarized hyphal growth in *Candida albicans* requires the Wiskott-Aldrich Syndrome protein homolog Wal1p. *Eukaryot Cell.* 3:471-82.
- Wasserman, S. 1998. FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol.* 8:111-5.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B.M. Jockusch, and S. Narumiya. 1997. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J.* 16:3044-56.

- Wendland, B., J.M. McCaffery, Q. Xiao, and S.D. Emr. 1996. A novel fluorescence-activated cell sorter-based screen for yeast endocytosis mutants identifies a yeast homologue of mammalian eps15. *J Cell Biol.* 135:1485-500.
- Wendland, J. 2001. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genet Biol.* 34:63-82.
- Wendland, J., and P. Philippsen. 2001. Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics.* 157:601-10.
- Wendland, J., D. Hellwig, A. Walther, S. Sickinger, Y. Shadkchan, R. Martin, J. Bauer, N. Osherov, A. Tretiakov, and H.P. Saluz 2006. Use of the Porcine Intestinal Epithelium (PIE)-Assay to analyze early stages of colonization by the human fungal pathogen *Candida albicans*. *J Basic Microbiol.* 46:513-523.
- Wilson, R.B., D. Davis, and A.P. Mitchell. 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol.* 181:1868-74.
- Winter, D., T. Lechler, and R. Li. 1999. Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol.* 9:501-4.
- Winter, D., A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and R. Li. 1997. The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol.* 7:519-29.
- Wyrick, J.J., F.C. Holstege, E.G. Jennings, H.C. Causton, D. Shore, M. Grunstein, E.S. Lander, and R.A. Young. 1999. Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature.* 402:418-21.
- Xu, Y., J.B. Moseley, I. Sagot, F. Poy, D. Pellman, B.L. Goode, and M.J. Eck. 2004. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell.* 116:711-23.
- Zahner, J.E., H.A. Harkins, and J.R. Pringle. 1996. Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 16:1857-70.
- Zheng, X.D., Y.M. Wang, and Y. Wang. 2003. CaSPA2 is important for polarity establishment and maintenance in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 49:1391-405.

6.2. Eigene Literatur

- Susanne Gola, **Ronny Martin**, Andrea Walther, Alexander Dünkler and Jürgen Wendland. 2003. New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100bp of flanking homology region. *Yeast.* 20: 1339-47
- Ronny Martin**, Andrea Walther and Jürgen Wendland. 2004. Deletion of the dynein heavy chain-gene DYN1 leads to aberrant nuclear positioning and defective hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* 3: 1574-88
- Ronny Martin**, Andrea Walther and Jürgen Wendland. 2005. Ras1-induced hyphal development in *Candida albicans* requires the formin Bni1. *Eukaryotic Cell.* 4: 1712-24
- Jürgen Wendland, Daniela Hellwig, Andrea Walther, Stefan Sickinger, Yona Shadkchan, **Ronny Martin**, Janine Bauer, Nir Osherov, Alexander Tretiakov and Hans-Peter Saluz. 2006. Use of the Porcine Intestinal Epithelium (PIE)-Assay to analyze early stages of colonization by the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Journal of Basic Microbiology.* 46:513-523.
- Ronny Martin**, Yvonne Schaub, Daniela Hellwig and Jürgen Wendland. 2006. Functional analysis of six *Candida albicans* genes whose *Saccharomyces cerevisiae* homologs are involved in endocytosis and chitin synthesis. *Yeast.* In der Revision.

7. Abkürzungsverzeichnis

7. Abkürzungsverzeichnis

5-FOA	5'-Fluororotische Säure
bp	base pair (Basenpaar)
CSM	Complete Supplement Medium
DIC	Differential Interference Contrast
GFP	Green Fluorescent Protein (Grünfluoreszierendes Protein)
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
SD	Synthetic Dextrose Medium
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
YFP	Yellow Fluorescent Protein (Gelbfluoreszierendes Protein)
YPD	Yeast-extract Peptone Dextrose medium

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn entsprechen, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Jena, Dezember 2006

.....

Ronny Martin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonders Prof. Jürgen Wendland für die interessanten Projekte und die Bereitstellung aller notwendigen Mittel danken. Die vielen Diskussionen waren sehr hilfreich bei der Erstellung dieser Arbeit und prägend für meine wissenschaftliche Entwicklung. Außerdem danke ich ihm für die Begutachtung der Arbeit.

Dr. Andrea Walther danke ich für die produktive Zusammenarbeit und die vielen guten Ratschläge in den letzten Jahren. Bei ihr und allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wendland möchte ich mich für die Unterstützung und die gute Stimmung bedanken.

Alexander und Christian danke ich für die vielen gemeinsamen Stunden in der Mensa und die tolle Zusammenarbeit im Laboralltag.

Daniela Hellwig danke ich für das Zuhören und die Fähigkeit, mich in jeder Situation aufzuheitern.

Rex Torka danke ich die gemeinsamen Abende bei einem Glas Guinness und die Diskussionen über den Sinn und Unsinn des Lebens.

Prof. Erika Kothe danke ich für die vielen guten Ratschläge und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Joachim Morschhäuser bin ich sehr dankbar, dass er sich die Zeit genommen hat, diese Arbeit zu begutachten.

Vor allem danke ich meinen Eltern, ohne deren liebevolle Unterstützung ich nichts von alledem erreicht hätte.